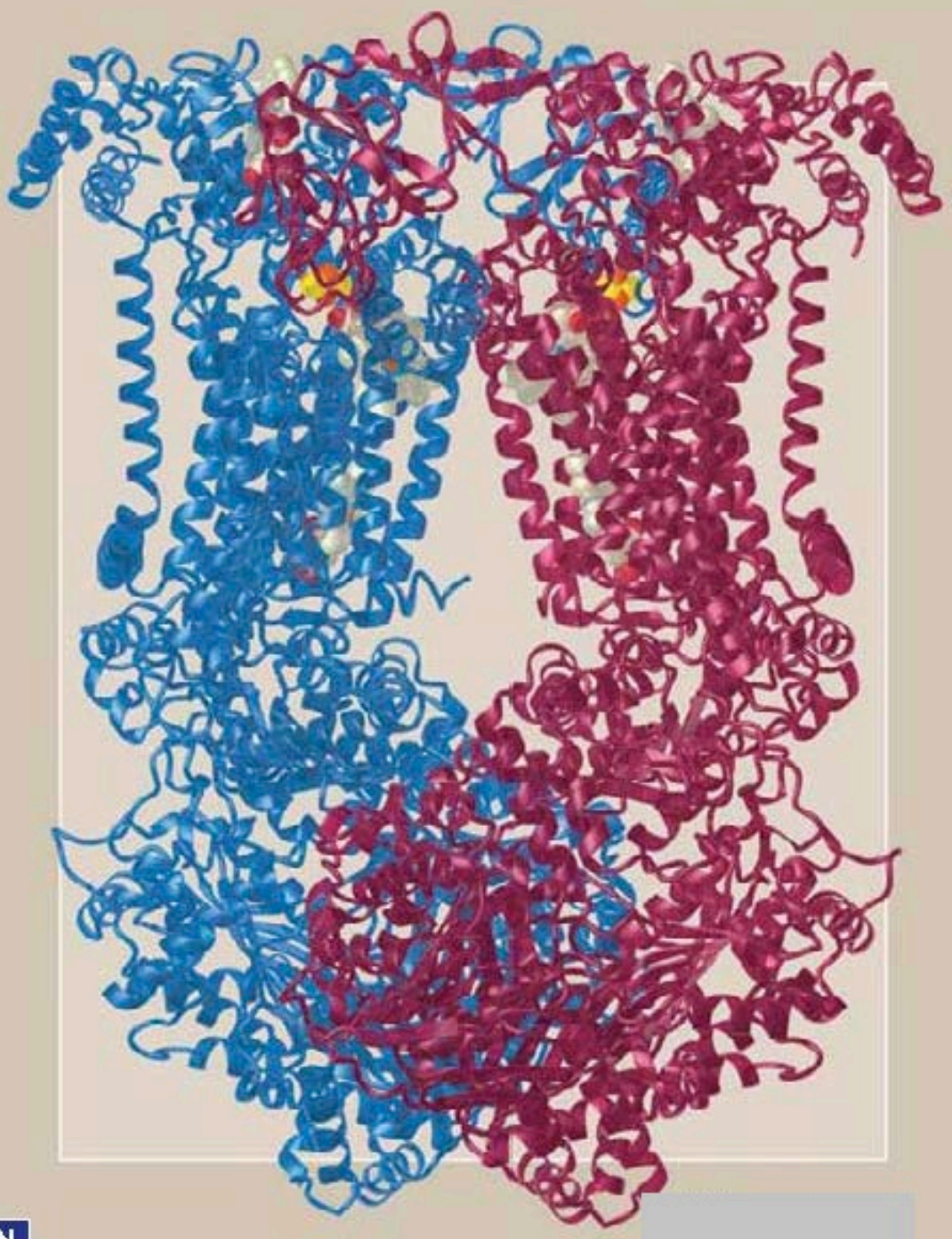
PRINCIPIOS DE BIOQUÍMICA

CUARTA EDICIÓN



Horton Moran Scrimgeour Perry Rawn

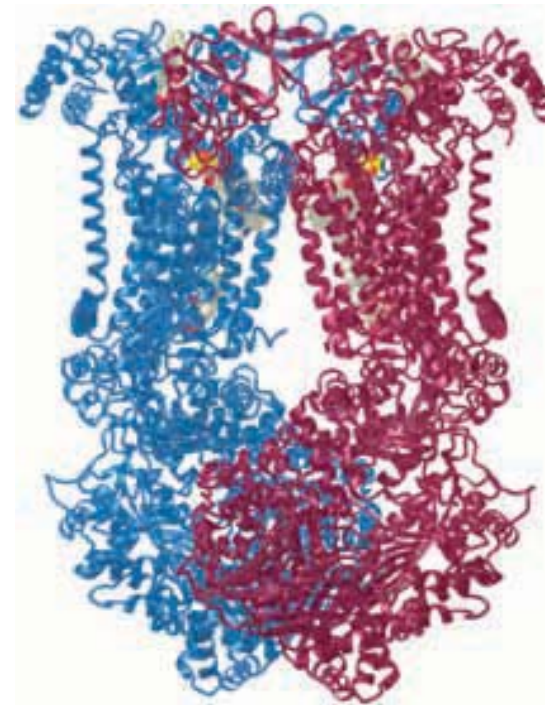
PEARSON Prentice Hall

Primera posición (terminación 5′)	Segunda posición U	C	A	G	Tercera posición (terminación 3′)
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Paro	Paro	A
	Leu	Ser	Paro	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Abreviaturas para aminoácidos		
A	Ala	Alanina
B	Asx	Asparagina o aspartato
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Aspartato
E	Glu	Glutamato
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptofano
Y	Tyr	Tirosina
Z	Glx	Glutamato o glutamina

Principios de Bioquímica

CUARTA EDICIÓN



H. Robert Horton
North Carolina State University

Laurence A. Moran
University of Toronto

K. Gray Scrimgeour
University of Toronto

Marc D. Perry
University of Toronto

J. David Rawn
Towson State University

TRADUCCIÓN

Virgilo González y Pozo
Traductor profesional

REVISIÓN TÉCNICA

Dra. Leticia Bucio Ortiz
Departamento Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

Dra. Verónica Souza Arroyo
Departamento Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz
Departamento Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

PEARSON Educación ®

México • Argentina • Brasil • Colombia • Costa Rica • Chile • Ecuador
España • Guatemala • Panamá • Perú • Puerto Rico • Uruguay • Venezuela

Datos de catalogación bibliográfica

HORTON, H. ROBERT; MORAN, LAURENCE A.; SCRIMGEOUR, K. GRAY; PERRY, MARK D.; RAWN, J. DAVID

Principios de Bioquímica. Cuarta edición

PEARSON EDUCACIÓN, México, 2008
ISBN: 978-970-26-1025-0
Área: Universitarios

Formato: 21 × 27 cm Páginas: 976

Authorized translation from the English language edition, entitled Principles of biochemistry 4th ed., by H. Robert Horton, Laurence A. Moran, K. Gray Scrimgeour, Marc D. Perry and J. David Rawn published by Pearson Education, Inc., publishing as Prentice Hall, Copyright, 2006. All rights reserved.
ISBN 0-13-145306-8

Traducción autorizada de la edición en idioma inglés, titulada Principles of biochemistry 4ª ed., por H. Robert Horton, Laurence A. Moran, K. Gray Scrimgeour, Marc D. Perry y J. David Rawn publicada por Pearson Education, Inc., publicada como Prentice Hall, Copyright, 2006. Todos los derechos reservados.

Esta edición en español es la única autorizada.

Edición en español
Editor: Rubén Fuerte Rivera
e-mail: ruben.fuerte@pearsoned.com
Editora de desarrollo: Claudia Celia Martínez Amigón
Supervisor de producción: Rodrigo Romero Villalobos

Edición en inglés

Executive Editor: Gary Carlson
Executive Managing Editor: Kathleen Schiaparelli
Marketing Manager: Andrew Gilfillan
Production Supervision/Composition: Marty Sopher/CMyK Associates
Managing Editor, Audio Visual Assets and Production: Patricia Burns
Art Editors: Jay McElroy, Connie Long
Art Studio: Artworks/Jonathan Parrish
Senior Media Editor: Patrick Shriner
Managing Editor, Science Media: Nicole Bush
Assistant Managing Editor, Science Supplements: Becca Richter
Development Editor: John Murdzek
Project Manager: Crissy Dudonis
Director of Creative Services: Paul Belfanti
Art Director: Kenny Beck
Cover and Interior Design: Koala Bear Design
Cover Illustrator: Jonathan C. Parrish
Manufacturing Manager: Alexis Heydt-Long
Manufacturing Buyer: Alan Fischer
Photo Researcher: Diane Austin
Director, Image Resource Center: Melinda Reo
Manager, Rights and Permissions: Zina Arabia
Interior Image Specialist: Beth Boyd-Brenzel
Cover Image Specialist: Karen Sanatar
Image Permission Coordinator: Robert Farrell
Editorial Assistants: Nancy Bauer, Jennifer Hart

CUARTA EDICIÓN, 2008

D.R. © 2008 por Pearson Educación de México, S.A. de C.V.
Atlacomulco No. 500, 5° piso
Col. Industrial Atoto
53519 Naucalpan de Juárez, Edo. de México
E-mail: editorial.universidades@pearsoned.com

Cámara Nacional de la Industria Editorial Mexicana. Reg. Núm. 1031

Acerca de la portada: Complejo III (ubiquinol: citocromo c oxidorreductasa). Este complejo de unión a membrana tiene una función esencial en el transporte electrónico asociado a las membranas y la generación del gradiente de protones que por último dará origen a nuevas moléculas de ATP. El complejo III cataliza la reacción del ciclo-Q: una de las rutas más importantes en bioquímica. (Ver página 427.)

Prentice Hall es una marca registrada de Pearson Educación de México, S.A. de C.V.

Reservados todos los derechos. Ni la totalidad ni parte de esta publicación pueden reproducirse, registrarse o transmitirse, por un sistema de recuperación de información, en ninguna forma ni por ningún medio, sea electrónico, mecánico, fotoquímico, magnético o electroóptico, por fotocopia, grabación o cualquier otro, sin permiso previo por escrito del editor.

El préstamo, alquiler o cualquier otra forma de cesión de uso de este ejemplar requerirá también la autorización del editor o de sus representantes.

ISBN 10: 970-26-1025-7
ISBN 13: 978-970-26-1025-0

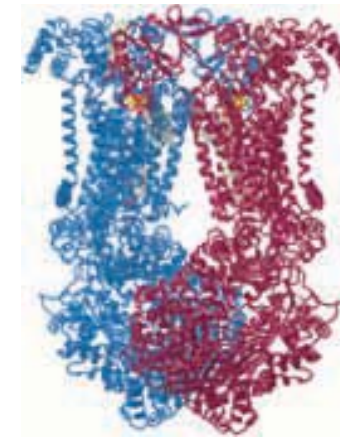
Impreso en México. *Printed in Mexico.*

1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 – 10 09 08 07

La ciencia debe ser lo más sencilla posible, pero no más simple.

—Albert Einstein

Los autores



H. Robert Horton

El doctor Horton obtuvo su doctorado en la University of Missouri en 1962, es profesor emérito William Neal Reynolds y profesor emérito y ex alumno distinguido del Departamento de Bioquímica en North Carolina State University, donde prestó servicios como académico por más de 30 años. La mayor parte de la investigación del profesor Horton se ha basado en los mecanismos de proteínas y enzimas.

Laurence A. Moran

Después de obtener su doctorado en la Princeton Universtiy en 1974, el profesor Moran pasó cuatro años en la Université dè Geneve en Suiza. Ha sido miembro del Departamento de Bioquímica en la University of Toronto desde 1978, y se ha especializado en biología y evolución molecular. Sus hallazgos acerca de los genes de respuesta al calor se han publicado en muchas revistas académicas.

K. Gray Scrimgeour

El profesor Scrimgeour obtuvo su doctorado en la University of Washington en 1961 y ha sido miembro del claustro de profesores en la University of Toronto desde 1967. Es autor de *The Chemistry and Control of Enzymatic Reactions* (1977, Academic Press), y durante los pasados 40 años ha publicado su trabajo sobre sistemas enzimáticos mediante más de 50 artículos de publicaciones profesionales. De 1984 a 1992, fue editor de la revista *Biochemistry and Cell Biology.*

Marc D. Perry

Después de obtener su doctorado en la University of Toronto en 1988, el doctor Perry ingresó a la University of Colorado, donde estudió la determinación de los sexos en el nematodo *C. elegans*. En 1994 regresó a la University of Toronto como miembro del claustro de profesores en el Departamento de Genética Molecular y Médica. Su investigación se ha centrado en la genética del desarrollo, meiosis y bioinformática. En 2004 se unió al Heart & Stroke / Richard Leward Centre of Excellence in Cardiovascular Research en la Facultad de Medicina de la University of Toronto.

J. David Rawn

El profesor Rawn recibió su doctorado en la Ohio State University en 1971 y ha sido catedrático e investigador en el Departamento de Química de Townson State University durante los pasados 25 años. Si bien no escribió algún capítulo sobre *Principios de bioquímica*, su libro de texto *Biochemistry* (1989, Neil Patterson) ha servido como fuente de información e ideas en lo concerniente al contenido y organización.

Los doctores Laurence A. Moran de la University of Toronto, y Elizabeth S. Roberts-Kirchhoff de la University of Detroit Mercy, fueron los creadores de los nuevos problemas y soluciones de esta cuarta edición. Los problemas restantes fueron elaborados por los doctores Robert N. Lindquist, San Francisco State University, Marc Perry y Diane M. De Abreu de la University of Toronto.

Suplementos para los estudiantes

SITIO WEB COMPANION

Herramienta en línea para los estudiantes, que cuenta con módulos tridimensionales que les ayudarán a visualizar los laboratorios de bioquímica y de medios para la investigación de aspectos importantes relacionados con los capítulos de este libro. Favor de visitar el sitio en **http://www.pearsoneducacion.net.com/horton.**

Contenido breve

PARTE UNO
Introducción

1 Introducción a la bioquímica 1
2 El agua 26

PARTE DOS
Estructura y función

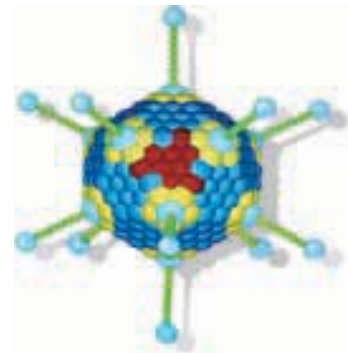
3 Los aminoácidos y la estructura primaria de las proteínas 52
4 Proteínas: Estructura tridimensional y función 84
5 Propiedades de las enzimas 129
6 Mecanismos de las enzimas 158
7 Coenzimas y vitaminas 192
8 Carbohidratos 222
9 Lípidos y membranas 253

PARTE TRES
Metabolismo y bioenergética

10 Introducción al metabolismo 296
11 Glicólisis 327
12 Gluconeogénesis, la ruta de la pentosa fosfato y el metabolismo del glucógeno 357
13 El ciclo del ácido cítrico 384
14 Transporte de electrones y síntesis de ATP 415
15 Fotosíntesis 444
16 Metabolismo de lípidos 479
17 Metabolismo de aminoácidos 520
18 Metabolismo de nucleótidos 557

PARTE CUATRO
Flujo de información biológica

19 Ácidos nucleicos 583
20 Replicación, reparación y recombinación del ADN 615
21 Transcripción y procesamiento del ARN 647
22 Síntesis de proteínas 683
23 Tecnología del ADN recombinante 719



Contenido

Prefacio xxv

PARTE UNO
Introducción

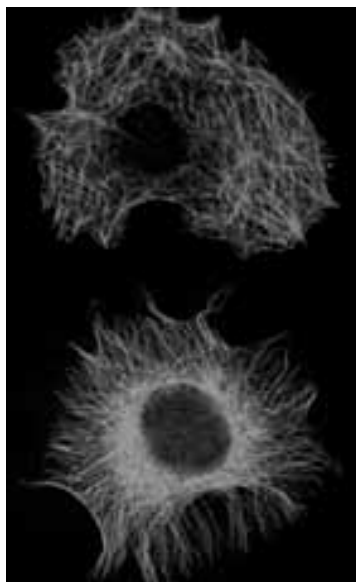
1 Introducción a la bioquímica 1

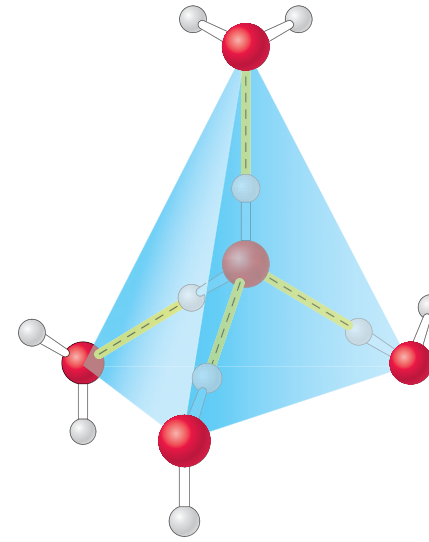
1.1 La bioquímica es una ciencia moderna 2
1.2 Los elementos químicos de la vida 3
1.3 Muchas macromoléculas importantes son polímeros 5
- A. Proteínas 6
- B. Polisacáridos 7
- C. Ácidos nucleicos 9
- D. Lípidos y membranas 10

1.4 La energética de la vida 11
- A. Velocidades de reacción y equilibrios 12
- B. Termodinámica 13
- C. Constantes de equilibrio y cambios en la energía libre estándar de Gibbs 15

1.5 Bioquímica y evolución 15
1.6 La célula es la unidad básica de la vida 16
1.7 Células procarióticas: características estructurales 17
1.8 Células eucarióticas: características estructurales 18
- A. Núcleo 18
- B. El retículo endoplásmico y el aparato de Golgi 19
- C. Mitocondrias y cloroplastos 20
- D. Vesículas especializadas 21
- E. El citoesqueleto 22

1.9 Un retrato de la célula viviente 22
1.10 La bioquímica es multidisciplinaria 24
Apéndice: La terminología especial de la bioquímica 24
Lecturas seleccionadas 25





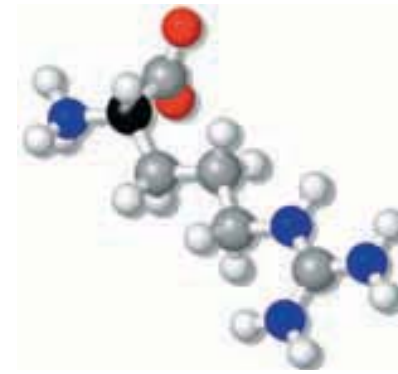
2 El agua 26

2.1 La molécula de agua es polar 27
2.2 Puentes de hidrógeno en el agua 28
2.3 El agua es un solvente excelente 30
A. Las sustancias iónicas y polares se disuelven en agua 30
B. Concentraciones celulares y difusión 31
C. Presión osmótica 31
2.4 Las sustancias no polares son insolubles en agua 32
2.5 Interacciones no covalentes 33
A. Interacciones carga-carga 33
B. Puentes de hidrógeno 34
C. Fuerzas de van der Waals 35
D. Interacciones hidrofóbicas 36
2.6 El agua es nucleofílica 36
2.7 Ionización del agua 37
2.8 La escala de pH 39
Recuadro 2.1 La pequeña "P" en pH 40
2.9 Constantes de disociación de ácidos débiles 41
2.10 Soluciones amortiguadoras para resistir cambios de pH 46
Resumen 49
Problemas 49
Lecturas seleccionadas 51

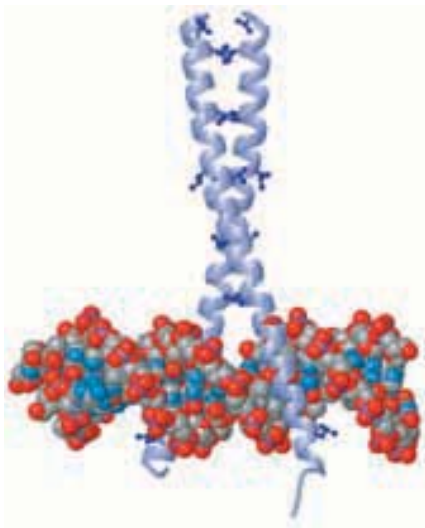
PARTE DOS
Estructura y función

3 Los aminoácidos y la estructura primaria de las proteínas 52

3.1 Estructura general de los aminoácidos 53
3.2 Estructuras de los 20 aminoácidos comunes 55
Recuadro 3.1 Una nomenclatura alternativa 56
A. Grupos R alifáticos 57
Recuadro 3.2 Nombres comunes de aminoácidos 57
B. Grupos R aromáticos 58
C. Grupos R sulfurados 58
D. Cadenas laterales con grupos alcohol 59
E. Grupos R básicos 59
F. Grupos R ácidos y sus amidas derivadas 60
G. Hidrofobicidad de las cadenas laterales de aminoácidos 60
3.3 Otros aminoácidos y derivados de aminoácido 61
3.4 Ionización de los aminoácidos 62
3.5 Unión de aminoácidos por enlaces peptídicos en las proteínas 66
3.6 Técnicas de purificación de las proteínas 67
3.7 Técnicas analíticas 69
3.8 Composición en aminoácidos de las proteínas 72
3.9 Determinación de la secuencia de los residuos de aminoácido 73
3.10 Estrategias de secuenciación de proteínas 75
3.11 Relaciones evolutivas a partir de comparaciones de las estructuras primarias de las proteínas 78



Resumen 81
Problemas 81
Lecturas seleccionadas 83

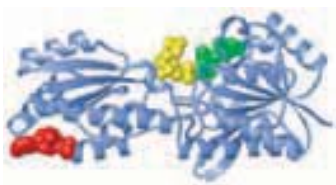


4 Proteínas: Estructura tridimensional y función 84

4.1 Hay cuatro niveles de estructura de las proteínas 86
4.2 Métodos para determinar la estructura de las proteínas 87
4.3 Conformación del grupo peptídico 90
4.4 La hélice α 92
4.5 Hebras α y láminas β 95
4.6 Asas y giros 97
4.7 Estructura terciaria de las proteínas 98
A. Estructuras supersecundarias 99
B. Dominios 100
C. Estructura y función de los dominios 104
4.8 Estructura cuaternaria 104
4.9 Desnaturalización y renaturalización de las proteínas 107
4.10 Plegado de proteínas y estabilidad 110
A. El efecto hidrofóbico 110
B. Puentes de hidrógeno 111
C. Interacciones de van der Waals e interacciones entre cargas 112
D. Los chaperones moleculares colaboran en el plegamiento de las proteínas 112
4.11 La colágena, una proteína fibrosa 115
4.12 Estructuras de la mioglobina y la hemoglobina 116
4.13 Enlazamiento del oxígeno con la mioglobina y la hemoglobina 118
A. Unión reversible del oxígeno al hemo 118
B. Curvas de unión de mioglobina y hemoglobina con el oxígeno 119
C. Hemoglobina como proteína alostérica 121
4.14 Los anticuerpos se unen a antígenos específicos 123
Resumen 125
Problemas 125
Lecturas seleccionadas 127

5 Propiedades de las enzimas 129

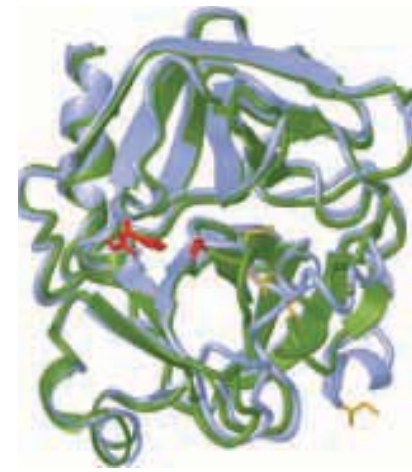
5.1 Las seis clases de enzimas 130
5.2 Experimentos cinéticos revelan propiedades de las enzimas 132
A. Cinética química 133
B. Cinética enzimática 134
5.3 Ecuación de Michaelis-Menten 135
A. Deducción de la ecuación de Michaelis-Menten 136
B. Constante catalítica k_{cat} 138
C. Significados de K_m 138
5.4 Las constantes cinéticas indican la actividad enzimática y la eficiencia catalítica 139
5.5 Medición de K_m y $V_{máx}$ 140
5.6 Cinética de las reacciones con sustratos múltiples 141
Recuadro 5.1 Hipérbolas y rectas 141



5.7 Inhibición reversible de enzimas 142
A. Inhibición competitiva 143
B. Inhibición acompetitiva 145
C. Inhibición no competitiva 146
D. Usos de la inhibición enzimática 146
5.8 Inhibición enzimática irreversible 147
5.9 Enzimas alostéricas 148
5.10 Regulación de la actividad enzimática 148
A. Fosfofructocinasa, una enzima alostérica 149
B. Propiedades generales de las enzimas alostéricas 150
C. Dos teorías de la regulación alostérica 152
D. Regulación por modificación covalente 153
5.11 Complejos multienzimáticos y enzimas multifuncionales 154
Resumen 154
Problemas 155
Lecturas seleccionadas 157

6 Mecanismos de las enzimas 158

6.1 Terminología de la química mecanicista 158
A. Sustituciones nucleofílicas 159
B. Reacciones de ruptura 160
C. Reacciones de oxido-reducción 160
6.2 Estabilización de estados de transición mediante catalizadores 160
6.3 Modos químicos de la catálisis enzimática 162
Recuadro 6.1 Modificación de enzimas por mutagénesis dirigida al sitio 163
A. Residuos polares de aminoácidos en sitios activos 163
B. Catálisis ácido-base 164
C. Catálisis covalente 165
D. Influencia del pH sobre las velocidades de reacción enzimática 166
6.4 Reacciones controladas por difusión 167
A. Triosa fosfato isomerasa 167
B. Superóxido dismutasa 170
6.5 Modos de enlazamiento en la catálisis enzimática 171
A. El efecto de proximidad 172
B. Enlazamiento débil de sustratos con enzimas 172
C. Ajuste inducido 174
D. Estabilización del estado de transición 175
6.6 Lisozima 178
Recuadro 6.2 Estado de transición propuesto para una reacción bimolecular 181
6.7 Propiedades de las serina proteasas 182
A. Los zimógenos son los precursores inactivos de las enzimas 182
B. Especificidad de las serina proteasas hacia el sustrato 183
C. Catálisis química y por modos de enlazamiento de las serina proteasas 184
Resumen 188
Problemas 188
Lecturas seleccionadas 191

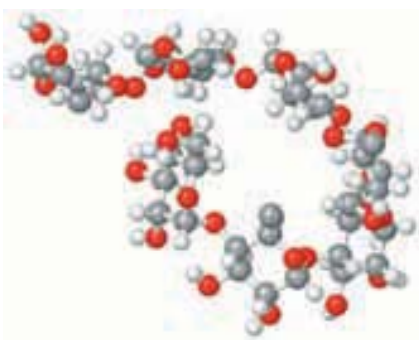


7 Coenzimas y vitaminas 192

7.1 Muchas enzimas requieren cationes inorgánicos 193
7.2 Clasificación de las coenzimas 193
Recuadro 7.1 Vitamina C: es vitamina, pero no es coenzima 195
7.3 ATP y otros cosustratos nucleótidos 196
7.4 $NAD^{\oplus}$ y $NADP^{\oplus}$ 197
Recuadro 7.2 Vitamina C: es vitamina, pero no es coenzima 199
7.5 FAD y FMN 200
7.6 Coenzima A 201
7.7 Pirofosfato de tiamina 202
7.8 Fosfato de piridoxal 203
7.9 Biotina 207
7.10 Tetrahidrofolato 208
7.11 Cobalamina 210
7.12 Lipoamida 212
7.13 Vitaminas lipídicas 212
A. Vitamina A 213
B. Vitamina D 213
C. Vitamina E 213
D. Vitamina K 214
7.14 Ubiquinona 214
7.15 Proteínas coenzimas 215
7.16 Citocromos 216
Resumen 218
Problemas 219
Lecturas seleccionadas 221

8 Carbohidratos 222

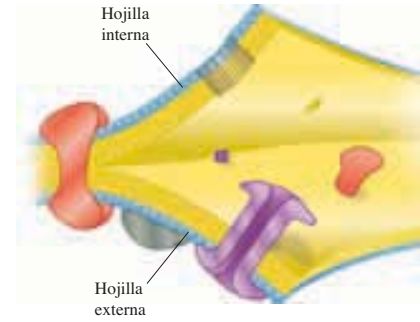
8.1 La mayor parte de los monosacáridos son compuestos quirales 223
8.2 Ciclación de aldosas y hexosas 226
8.3 Conformaciones de los monosacáridos 229
8.4 Derivados de los monosacáridos 231
A. Fosfatos de azúcar 231
B. Desoxiazúcares 231
C. Aminoazúcares 231
D. Azúcares alcoholes 232
E. Azúcares ácidos 233
F. Ácido ascórbico 234
8.5 Disacáridos y otros glicósidos 234
A. Estructuras de los disacáridos 234
B. Azúcares reductores y no reductores 236
C. Nucleótidos y otros glicósidos 236
8.6 Polisacáridos 237
A. Almidón y glucógeno 237
B. Celulosa y quitina 239
8.7 Glicoconjugados 241
A. Proteoglicanos 241
B. Peptidoglicanos 243
Recuadro 8.1 Los factores de nodulación son lipo-oligosacáridos 243

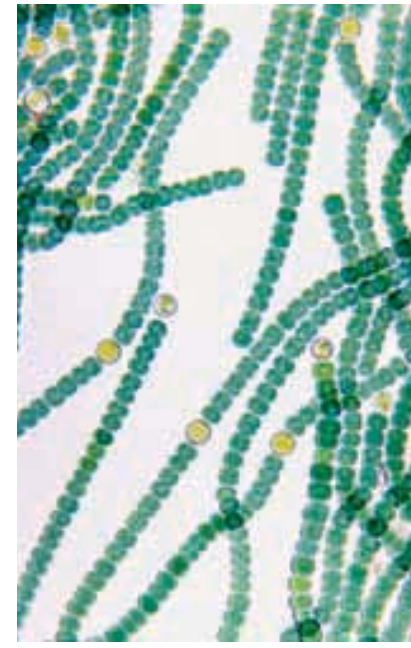


C. Glicoproteínas 244
Recuadro 8.2 El grupo sanguíneo ABO 248
Resumen 249
Problemas 250
Lecturas seleccionadas 252

9 Lípidos y membranas 253

9.1 Diversidad estructural y funcional de los lípidos 253
9.2 Ácidos grasos 254
Recuadro 9.1 Nombres comunes de los ácidos grasos 255
Recuadro 9.2 Ácidos grasos *trans* y margarina 256
9.3 Triacilgliceroles 258
9.4 Glicerofosfolípidos 259
9.5 Esfingolípidos 262
9.6 Esteroides 264
9.7 Otros lípidos de importancia biológica 264
9.8 Las membranas biológicas están formadas por bicapas lipídicas y proteínas 267
Recuadro 9.3 En el estudio de los lípidos deben usarse técnicas no acuosas especiales 268
A. Bicapas lipídicas 269
B. Modelo fluido de mosaico para membranas biológicas 270
9.9 Las bicapas lipídicas y las membranas son estructuras dinámicas 271
9.10 Tres clases de proteínas de membrana 274
Recuadro 9.4 Nuevas vesículas de lípido o liposomas 275
9.11 Transporte de membrana 278
A. Termodinámica del transporte en la membrana 279
B. Poros y canales 280
C. Transporte pasivo 281
D. Transporte activo 281
E. Endocitosis y exocitosis 283
Recuadro 9.5 Lo picante de los chiles 284
9.12 Transducción de señales extracelulares 284
A. Las proteínas G son transductores de señal 285
B. La ruta de señalización con adenilil ciclasa 287
C. La ruta de señalización inositol-fosfolípido 288
Recuadro 9.6 Toxinas bacterianas y proteínas G 289
D. Receptor de tirosina cinasas 291
Resumen 292
Problemas 292
Lecturas seleccionadas 294



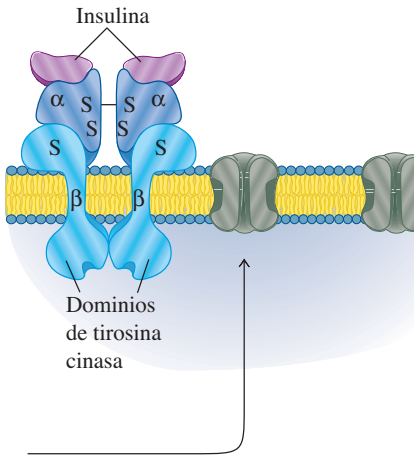


PARTE TRES
Metabolismo y bioenergética

10 Introducción al metabolismo 296

10.1 El metabolismo es la suma de las reacciones celulares 296
10.2 Rutas metabólicas 298
A. Las rutas son secuencias de reacciones 299

B. El metabolismo se efectúa en pasos discretos 300
C. Las rutas metabólicas están reguladas 301
D. Evolución de las rutas metabólicas 303
10.3 Principales rutas en las células 304
10.4 Compartimentación y metabolismo entre órganos 306
10.5 Determinación de la espontaneidad de las reacciones metabólicas por el cambio de energía libre real (no estándar) de energía libre de Gibbs 308
10.6 Energía libre del ATP 310
10.7 Funciones metabólicas del ATP 313
A. Transferencia de grupo fosforilo 314
B. Producción de ATP por transferencia de grupo fosforilo 315
C. Transferencia del grupo nucleotidilo 316
10.8 Los tioésteres tienen grandes energías libres de hidrólisis 317
10.9 Conservación de energía de las oxidaciones biológicas mediante coenzimas reducidas 318
A. Relación entre el cambio de energía libre de Gibbs y el potencial de reducción 319
B. Energía libre por transferencia de electrones de NADH 322
Recuadro 10.1 Diferencias en los espectros de absorción de $NAD^{\oplus}$ y NADH 322
10.10 Métodos experimentales para estudiar el metabolismo 323
Resumen 324
Problemas 324
Lecturas seleccionadas 326



11 Glicólisis 327

11.1 Reacciones enzimáticas de la glicólisis 328
11.2 Los diez pasos de la glicólisis catalizados por enzima 328
Recuadro 11.1 Breve historia de la ruta glicolítica 329
Recuadro 11.2 Formación de 2,3-*bi*fosfoglicerato en los glóbulos rojos 338
Recuadro 11.3 Envenenamiento con arseniato 340
11.3 Destino del piruvato 340
A. Metabolismo de piruvato a etanol 341
B. Reducción de piruvato a lactato 342
11.4 Cambios de energía libre en la glicólisis 343
11.5 Regulación de la glicólisis 344
A. Regulación de los transportadores de hexosas 344
B. Regulación de hexocinasa 346
Recuadro 11.4 Función metabólica esencial de la glucosa 6-fosfato en el hígado 346
C. Regulación de la fosfofructocinasa-1 347
D. Regulación de piruvato cinasa 348
E. El efecto Pasteur 350
11.6 Entrada de otros azúcares a la glicólisis 350
A. Conversión de fructosa en gliceraldehído 3-fosfato 350
B. Conversión de galactosa en glucosa 1-fosfato 351
C. Conversión de manosa en fructosa 6-fosfato 352
11.7 La ruta Entner-Doudoroff en las bacterias 352
Resumen 354
Problemas 354
Lecturas seleccionadas 355

12 Gluconeogénesis, la ruta de la pentosa fosfato y el metabolismo del glucógeno 357

12.1 Gluconeogénesis 358
- A. Piruvato carboxilasa 359
- B. Fosfoenolpiruvato carboxicinasa 360
- C. Fructosa 1,6-*bi*fosfatasa 361
- D. Glucosa 6-fosfatasa 361

12.2 Precursores para la gluconeogénesis 362
- A. Lactato 362
- B. Aminoácidos 363
- C. Glicerol 363
- D. Propionato y lactato 363
- E. Acetato 364

12.3 Regulación de la gluconeogénesis 364

Recuadro 12.1 A veces la glucosa se convierte en sorbitol 366

12.4 La ruta de las pentosas fosfato 366
- A. Etapa oxidante 368
- B. Etapa no oxidante 368

Recuadro 12.2 Deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa en humanos 369
- C. Interconversiones catalizadas por transcetolasa y transaldolasa 370

12.5 Metabolismo del glucógeno 371
- A. Síntesis de glucógeno 371
- B. Degradación del glucógeno 372

12.6 Regulación del metabolismo del glucógeno 374
- A. Regulación del metabolismo de glucógeno por las hormonas 375
- B. Regulación recíproca de glucógeno fosforilasa y glucógeno sintasa 375
- C. Acción de enzimas interconvertibles sobre la regulación intracelular del metabolismo del glucógeno 376

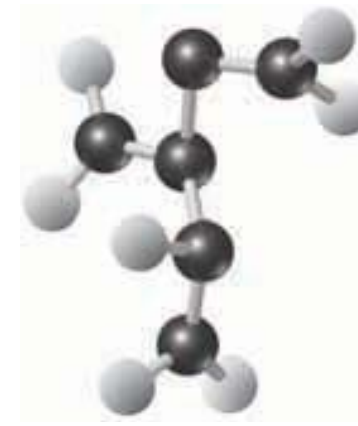
Recuadro 12.3 Enfermedades por almacenamiento de glucógeno 378

12.7 Conservación de niveles de glucosa en los mamíferos 379

Resumen 381

Problemas 382

Lecturas seleccionadas 383



13 El ciclo del ácido cítrico 384

13.1 Conversión de piruvato en acetil-CoA 385

13.2 Oxidación de la acetil-CoA en el ciclo del ácido cítrico 391

13.3 Enzimas del ciclo del ácido cítrico 393

Recuadro 13.1 ¿De dónde vienen los electrones? 394

Recuadro 13.2 Fijación de sustratos proquirales a enzimas en tres puntos 397

Recuadro 13.3 Conversión de una enzima en otra 402

13.4 Las coenzimas reducidas pueden generar la producción de ATP 403

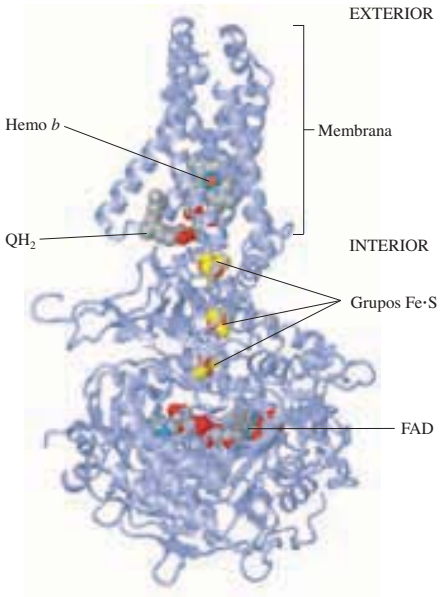
13.5 Regulación del ciclo del ácido cítrico 404

13.6 El ciclo del ácido cítrico no siempre es un "ciclo" 406

13.7 La ruta del glioxilato 407

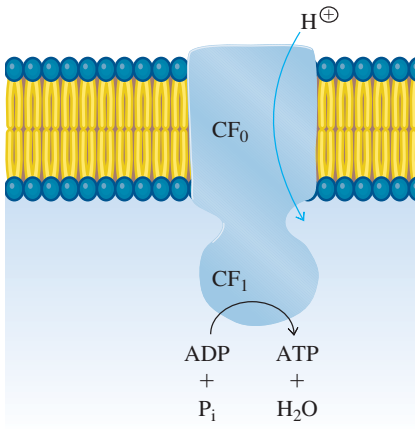
13.8 Evolución del ciclo del ácido cítrico 410

Resumen 412
Problemas 412
Lecturas seleccionadas 414



14 Transporte de electrones y síntesis de ATP 415

14.1 Descripción general del transporte de electrones asociado a membrana y la síntesis de ATP 416
14.2 La mitocondria 416
14.3 Teoría quimiosmótica y la fuerza protonmotriz 418
A. Antecedentes históricos: la teoría quimiosmótica 418
B. La fuerza protonmotriz 420
14.4 Transporte de electrones 421
A. Complejos I a IV 421
B. Cofactores en el transporte de electrones 424
14.5 Complejo I 424
14.6 Complejo II 425
14.7 Complejo III 427
14.8 Complejo IV 429
14.9 Complejo V: ATP sintasa 432
Recuadro 14.1 Fugas de protones y producción de calor 435
14.10 Transporte activo de ATP, ADP y P_i a través de la membrana mitocondrial 435
14.11 Relación P/O 436
14.12 Mecanismos de lanzadera de NADH en eucariotas 436
Recuadro 14.2 El alto costo de vivir 439
14.13 Otros aceptores y donadores terminales de electrones 439
14.14 Aniones superóxido 440
Resumen 441
Problemas 441
Lecturas seleccionadas 442

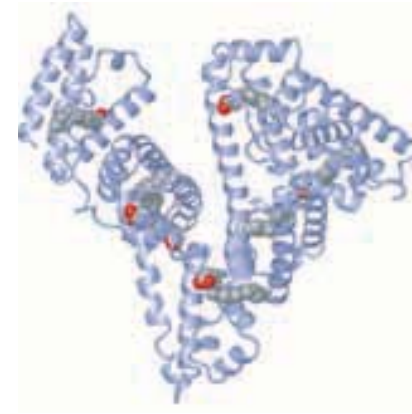


15 Fotosíntesis 444

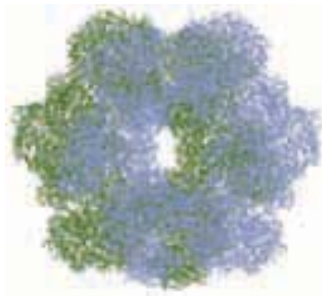
15.1 Pigmentos recolectores de luz 445
15.2 Fotosistemas bacterianos 449
A. Fotosistema II 449
B. Fotosistema I 452
C. Fotosistemas acoplados y citocromo *bf* 455
D. Potenciales de reducción y energía libre de Gibbs en la fotosíntesis 458
E. La fotosíntesis se efectúa dentro de las membranas internas 459
15.3 Fotosíntesis en las plantas 460
A. Cloroplastos 460
Recuadro 15.1 Bacteriorrodopsina 461
B. Fotosistemas vegetales 463
C. Organización de los fotosistemas del cloroplasto 463
15.4 Fijación del CO_2: el ciclo de Calvin 464
A. El ciclo de Calvin 465
B. Rubisco: Ribulosa 1,5-*bi*fosfato carboxilasa-oxigenasa 465
C. Oxigenación de la ribulosa 1,5-*Bi*fosfato 469
D. Ciclo de Calvin: Etapas de reducción y regeneración 470
Recuadro 15.2 Construcción de una Rubisco mejor 470

15.5 Metabolismo de sacarosa y almidón en las plantas 471
15.6 Otras rutas de fijación de carbono 473
Recuadro 15.3 Los guisantes rugosos de Gregor Mendel 473
A. La ruta C_4 474
B. Metabolismo del ácido crasuláceo 474
C. Fijación de carbono en las bacterias 476
Resumen 477
Problemas 477
Lecturas seleccionadas 478

16 Metabolismo de lípidos 479



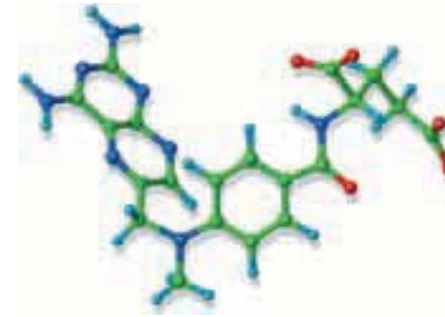
16.1 Síntesis de ácidos grasos 480
A. Síntesis de malonil ACP y acetil ACP 480
B. Reacción de iniciación en la síntesis de ácidos grasos 481
C. Reacciones de elongación en la síntesis de ácidos grasos 482
D. Activación de los ácidos grasos 483
E. Extensiones y desaturación de ácidos grasos 484
16.2 Síntesis de triacilgliceroles y de glicerofosfolípidos 485
16.3 Síntesis de eicosanoides 488
Recuadro 16.1 Búsqueda de un sustituto de la aspirina 490
16.4 Síntesis de éter lipídicos 490
16.5 Síntesis de esfingolípidos 491
Recuadro 16.2 Enfermedades por almacenamiento lisosoma 493
Recuadro 16.3 Regulación de las concentraciones del colesterol 494
16.6 Síntesis del colesterol 495
A. Etapa 1: De acetil-CoA a isopentenil difosfato 495
B. Etapa 2: De isopentenil difosfato a escualeno 496
C. Etapa 3: De escualeno a colesterol 496
D. Otros productos del metabolismo de isoprenoides 496
16.7 Oxidación de ácidos grasos 498
A. Reacciones de la β-oxidación 499
B. Síntesis de los ácidos grasos y la β-oxidación 500
C. Transporte de acil-CoA graso al interior de las mitocondrias 501
Recuadro 16.4 Enzima trifuncional para la β-oxidación 502
D. Generación de ATP a partir de la oxidación de los ácidos grasos 502
E. β-Oxidación de los ácidos grasos de cadena impar y no saturados 504
16.8 Formación de lípidos eucarióticos en diversos sitios 506
16.9 En los mamíferos, el metabolismo de los lípidos es regulado por hormonas 507
16.10 Absorción y movilización de los lípidos combustibles en los mamíferos 509
A. Absorción de los lípidos de la dieta 509
B. Lipoproteínas 510
Recuadro 16.5 Lipoproteína lipasa y enfermedad coronaria 513
C. Albúmina de suero 513
16.11 Cuerpos cetónicos: moléculas de combustible 513
A. Síntesis de cuerpos cetónicos en el hígado 514
B. Oxidación de los cuerpos cetónicos en las mitocondrias 515
Recuadro 16.6 Metabolismo alterado de los carbohidratos y de los lípidos en la diabetes 516



Resumen 517
Problemas 517
Lecturas seleccionadas 519

17 Metabolismo de aminoácidos 520

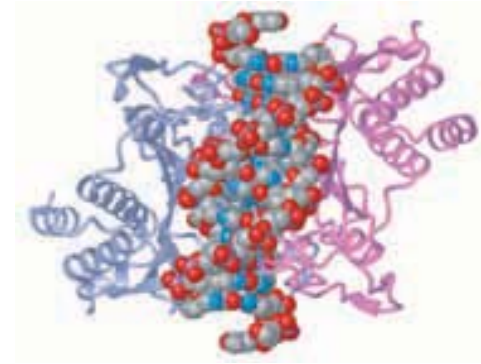
17.1 Ciclo del nitrógeno y fijación del nitrógeno 521
17.2 Asimilación del amoniaco 523
A. Incorporación de amoniaco a glutamato y glutamina 524
B. Reacciones de transaminación 524
17.3 Síntesis de aminoácidos 526
A. Aspartato y asparagina 526
Recuadro 17.1 Se puede tratar la leucemia linfoblástica infantil con asparaginasa 526
B. Lisina, metionina y treonina 527
C. Alanina, valina, leucina e isoleucina 528
D. Glutamato, glutamina, arginina y prolina 528
E. Serina, glicina y cisteína 529
F. Fenilalanina, tirosina y triptófano 531
Recuadro 17.2 Alimentos modificados genéticamente 533
Recuadro 17.3 Aminoácidos esenciales y no esenciales en los animales 534
G. Histidina 535
17.4 Aminoácidos como precursores metabólicos 536
A. Productos derivados de glutamato, glutamina y aspartato 536
B. Productos derivados de serina y glicina 536
C. Síntesis de óxido nítrico a partir de arginina 536
17.5 Recambio de proteínas 538
Recuadro 17.4 Apoptosis: muerte celular programada 538
17.6 Catabolismo de aminoácidos 539
A. Alanina, asparagina, aspartato, glutamato y glutamina 541
B. Arginina, histidina y prolina 541
C. Glicina y serina 542
D. Treonina 543
E. Aminoácidos de cadena ramificada 543
F. Metionina 545
G. Cisteína 546
H. Fenilalanina, triptófano y tirosina 546
Recuadro 17.5 Fenilcetonuria, defecto en la formación de tirosina 546
I. Lisina 548
Recuadro 17.6 Enfermedades del metabolismo de ácidos grasos 548
17.7 Ciclo de la urea: conversión de amoniaco en urea 549
A. Síntesis de carbamoíl fosfato 549
B. Reacciones del ciclo de la urea 549
C. Reacciones anexas al ciclo de la urea 550
Recuadro 17.7 El hígado está organizado para eliminar amoniaco tóxico 551
17.8 Producción de bicarbonato en el metabolismo renal de glutamina 553
Resumen 554
Problemas 555
Lecturas seleccionadas 556



18 Metabolismo de nucleótidos 557

18.1 Síntesis de los nucleótidos de purina 558
18.2 Síntesis de otros nucleótidos de purina a partir de IMP 561
Recuadro 18.1 Nombres comunes de las bases 561
18.3 Síntesis de nucleótidos de pirimidina 563
A. La ruta de síntesis de pirimidina 564
Recuadro 18.2 Transferencia de amoniaco a partir de glutamina por algunas enzimas 565
B. Regulación de la síntesis de pirimidina 566
18.4 Síntesis de CTP a partir de UMP 568
18.5 Reducción de ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos 569
18.6 La metilación de dUMP produce dTMP 570
Recuadro 18.3 Radicales libres en la reducción de ribonucleótidos 570
Recuadro 18.4 Los medicamentos contra el cáncer inhiben la síntesis de dTTP 572
18.7 Recuperación de purinas y pirimidinas 573
18.8 Catabolismo de purina 574
Recuadro 18.5 El síndrome de Lesch-Nyhan y la gota 576
18.9 Ciclo de nucleótidos de purina en los músculos 578
18.10 Catabolismo de la pirimidina 579
Resumen 580
Problemas 580
Lecturas seleccionadas 581

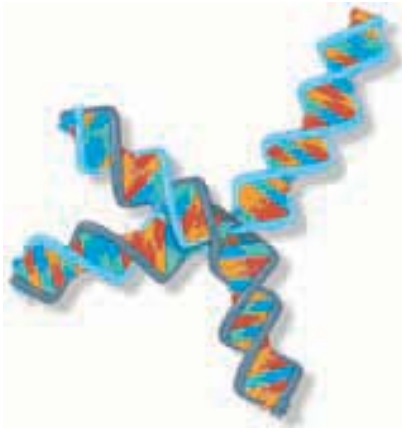
PARTE CUATRO
Flujo de información biológica



19 Ácidos nucleicos 583

19.1 Los nucleótidos son los bloques de construcción de los ácidos nucleicos 584
A. Ribosa y desoxirribosa 584
B. Purinas y pirimidinas 585
C. Nucleósidos 586
D. Nucleótidos 587
19.2 El ADN tiene doble hebra 590
A. Unión de nucleótidos por enlaces de 3′,5′fosfodiéster 590
B. Formación de una doble hélice con dos hebras antiparalelas 592
C. Estabilización de la doble hélice por fuerzas débiles 595
D. Conformaciones de ADN de doble hebra 597
19.3 Superenrollamiento del ADN 597
19.4 Diversos tipos de ARN en las células 599
19.5 Empaquetamiento del ADN en cromatina, en células eucariotas 599
A. Nucleosomas 600
Recuadro 19.1 Acetilación y desacetilación de histonas 601
B. Niveles superiores de estructura de la cromatina 603
C. Empacamiento del ADN bacteriano 604
19.6 Nucleasas e hidrólisis de ácidos nucleicos 605
A. Hidrólisis alcalina del ARN 605
B. Hidrólisis de ARN catalizada por ribonucleasa 605
C. Endonucleasas de restricción 608
D. Unión firme de *Eco*RI a ADN 610

19.7 Usos de las endonucleasas de restricción 610
Resumen 612
Problemas 612
Lecturas seleccionadas 613

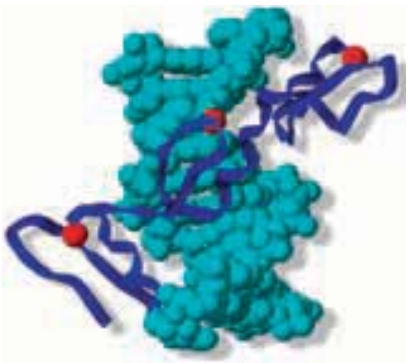


20 Replicación, reparación y recombinación del ADN 615

20.1 La replicación de ADN en cromosomas es bidireccional 616
20.2 ADN polimerasa 618
A. Elongación de la cadena; reacción de transferencia de grupo nucleotidilo 619
B. Permanencia de la ADN polimerasa III unida a la horquilla de replicación 621
C. Lectura de prueba para corregir errores 621
20.3 Síntesis simultánea de dos hebras por la ADN polimerasa 622
A. Síntesis discontinua de la hebra retrasada 623
B. Cada fragmento de Okazaki comienza con un ARN cebador 623
C. Unión de fragmentos de Okazaki por acción de ADN polimerasa I y ADN ligasa 624
20.4 Modelo del replisoma 626
20.5 Iniciación y terminación de la replicación de ADN 629
20.6 Replicación de ADN en eucariotas 630
Recuadro 20.1 Secuenciación del ADN con dideoxinucleótidos 632
20.7 Reparación de ADN dañado 634
A. Reparación después de fotodimerización: ejemplo de reparación directa 635
B. Reparación por escisión 635
20.8 Recombinación homóloga 639
A. Modelo Holliday de recombinación general 639
B. Recombinación en *E. coli* 640
C. La recombinación puede ser una forma de reparación 641
Recuadro 20.2 Vínculos moleculares entre reparación de ADN y el cáncer de mama 643
Resumen 644
Problemas 644
Lecturas seleccionadas 645

21 Transcripción y procesamiento del ARN 647

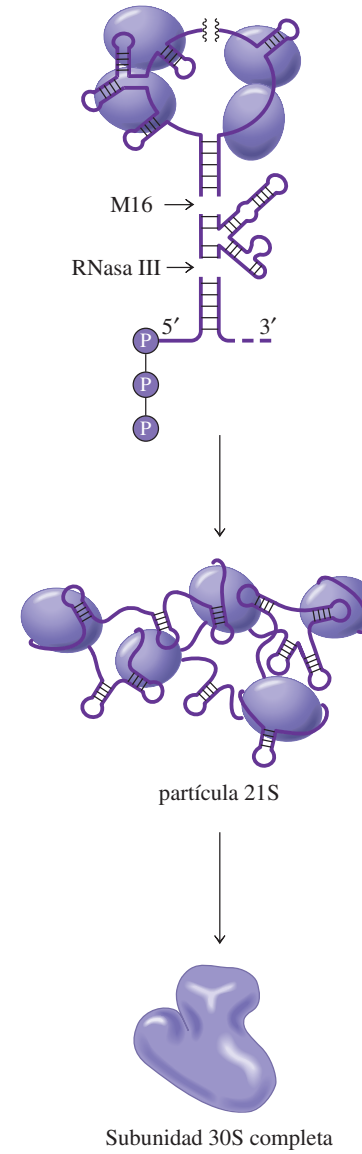
21.1 Tipos de ARN 648
21.2 ARN polimerasa 649
A. ARN polimerasa: proteína oligomérica 649
B. Reacción de elongación de la cadena 650
21.3 Inicio de la transcripción 652
A. Orientación 5′→3′ de los genes 652
B. El complejo de transcripción se ensambla en un promotor 653
C. Reconocimiento del promotor por la subunidad σ 655
D. Cambios de conformación en la ARN polimerasa 655
21.4 Terminación de la transcripción 656
21.5 Transcripción en eucariotas 659
A. ARN polimerasas eucarióticas 659
B. Factores de transcripción eucarióticos 662
C. Papel de la cromatina en la transcripción eucariótica 663
21.6 Regulación de la transcripción de genes 663

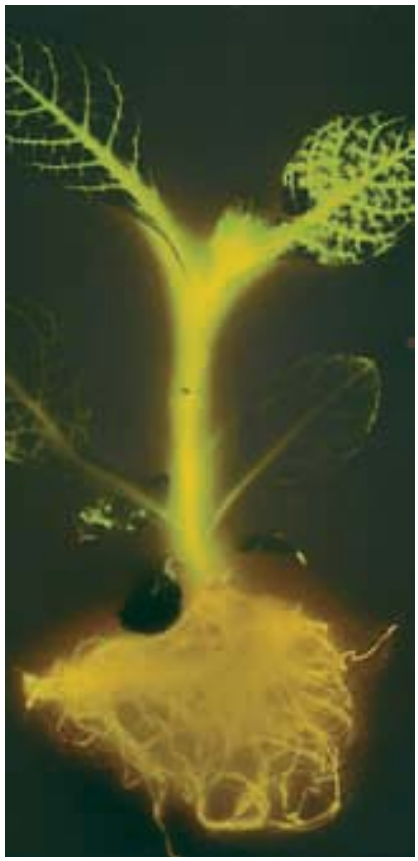


21.7 El operón *lac*, ejemplo de regulación positiva y negativa 665
A. Bloqueo de la transcripción por el represor *lac* 665
B. Estructura del represor *lac* 667
C. Activación de la transcripción por la proteína reguladora cAMP 668
21.8 Modificación postranscripcional del ARN 670
A. Procesamiento de ARN de transferencia 671
B. Procesamiento de ARN ribosómico 672
21.9 Procesamiento de ARNm eucariótico 674
A. Extremos modificados en las moléculas eucarióticas de ARNm 674
B. Empalme de algunos ARNm precursores eucarióticos 677
Resumen 680
Problemas 680
Lecturas seleccionadas 682

22 Síntesis de proteínas 683

22.1 El código genético 683
22.2 ARN de transferencia 686
A. La estructura tridimensional del ARNt 686
B. Apareamiento de bases de anticodones en ARNt con codones en ARNm 688
22.3 Aminoacil-ARNt sintetasas 688
A. Reacción de la aminoacil-ARNt sintetasa 689
B. Especificidad de las aminoacil-ARNt sintetasas 689
C. Actividad correctora de las aminoacil-ARNt sintetasas 691
22.4 Ribosomas 692
A. Los ribosomas están formados por ARN ribosómico y proteína 693
B. Los ribosomas contienen dos sitios de unión con aminoacil-ARNt 695
22.5 Iniciación de la traducción 695
A. ARNt de inicio 695
B. Complejos de iniciación: sólo se ensamblan en codones de inicio 695
C. Los factores de iniciación ayudan a formar el complejo de inicio 696
D. Inicio de la traducción en eucariotas 697
22.6 Alargamiento de cadena: microciclo de tres pasos 697
A. Los factores de alargamiento acoplan a un aminoacil-ARNt en el sitio A 699
B. La peptidil transferasa cataliza la formación del enlace peptídico 700
C. La traslocación mueve al ribosoma un codón 701
22.7 Terminación de la traducción 705
22.8 La síntesis de proteínas es costosa en energía 705
22.9 Regulación de la síntesis de proteínas 705
A. Acoplamiento de la síntesis de proteína con el ensamble del ribosoma en *E. coli* 706
Recuadro 22.1 Algunos antibióticos inhiben la síntesis de proteínas 707
B. La síntesis de globina depende de la disponibilidad de hemo 707
C. El operón *trp* de *E. coli* está regulado por represión y atenuación 708
22.10 Procesamiento postraduccional 712
A. La hipótesis de la señal 712
B. Glicosilación de proteínas 716
Resumen 716
Problemas 717
Lecturas seleccionadas 718





23 Tecnología del ADN recombinante 719

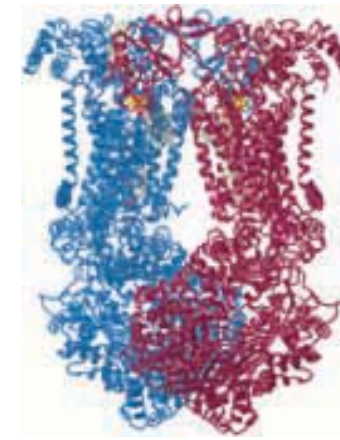
23.1 Preparación del ADN recombinante 719
23.2 Vectores de clonación 721
A. Plásmidos vectores 723
B. Vectores de bacteriófago λ 723
C. Vectores lanzadera 724
D. Cromosomas artificiales de levadura como vectores 724
23.3 Identificación de células anfitrión que contienen ADN recombinante 727
A. En las estrategias de selección se usan genes marcadores 727
B. Selección en eucariotas 727
C. Marcadores visuales: inactivación por inserción del gen de β-galactosidasa 727
23.4 Bibliotecas genómicas 728
Recuadro 23.1 El Proyecto Genoma Humano 728
23.5 Preparación de bibliotecas de ADNc a partir de ARNm 729
23.6 Selección de una biblioteca 730
23.7 Desplazamiento de cromosomas 733
23.8 Expresión de proteínas mediante tecnología de ADN recombinante 734
A. Vectores de expresión procarióticos 734
B. Expresión de proteínas en eucariotas 734
23.9 Aplicaciones de la tecnología de ADN recombinante 735
A. Ingeniería genética de plantas 737
B. Ingeniería genética en procariotas 737
23.10 Aplicaciones a enfermedades humanas 739
23.11 Amplificación de secuencias seleccionadas de ADN con la reacción en cadena de la polimerasa 741
Recuadro 23.2 Usos médicos de la PCR 741
23.12 Mutagénesis dirigida de ADN clonado 743
Resumen 744
Problemas 745
Lecturas seleccionadas 747

Soluciones 749

Créditos de ilustraciones 809

Glosario 811

Índice 827



Prefacio

Al estudiante

¡Bienvenido a la bioquímica!, el estudio de la vida a nivel molecular. A medida que se adentre en esta disciplina excitante y dinámica descubrirá muchas cosas nuevas y maravillosas. Aprenderá cómo algunas enzimas pueden catalizar reacciones químicas a velocidades cercanas a límites teóricos: —reacciones que, de otra manera, ocurrirían sólo a velocidades imperceptiblemente bajas. Conocerá las fuerzas que mantienen la estructura molecular y cómo incluso algunas de esas fuerzas más débiles hacen posible la vida. También aprenderá que la bioquímica tiene miles de aplicaciones en la vida cotidiana: en la medicina, diseño de fármacos, nutrición, ciencia forense, agricultura y manufactura. En resumen, comenzará un viaje de descubrimiento acerca de cómo la bioquímica mejora y hace posible la vida.

Antes de comenzar, nos gustaría ofrecerle algunos consejos:

No memorice los datos; en vez de ello, comprenda los principios

En este libro, se ha tratado de identificar los principios más importantes de la bioquímica. Cada año se publican millones de investigaciones, la mitad de ellas describen los resultados de hallazgos efectuados en alguna área de la bioquímica. Como la base de conocimientos bioquímicos se está expandiendo continuamente, es necesario entender los temas básicos de esta ciencia con el fin de comprenderla cabalmente. Este libro de texto está diseñado para ampliar las bases que ha adquirido en los cursos de química y biología y proporcionarle un marco de conocimientos bioquímicos que le permitirá entender nuevos fenómenos cuando se encuentre ante ellos. A medida que progrese en sus estudios, encontrará muchos ejemplos que dan sentido al marco que se describe. Estos datos individuales son útiles para esclarecer los principios básicos.

Esté preparado para aprender un nuevo vocabulario

La comprensión de los datos bioquímicos requiere el aprendizaje de un vocabulario bioquímico. Este vocabulario incluye las estructuras químicas de varias moléculas clave. Estas moléculas están agrupadas en familias basadas en sus estructuras y funciones. También aprenderá a distinguir entre los miembros de cada familia y de qué forma las pequeñas moléculas se combinan para formar macromoléculas como las proteínas y los ácidos nucleicos. Igual que con cualquier nueva disciplina que estudie, cuanto más familiarizado se encuentre con el vocabulario más fácil aprenderá a valorar la literatura científica.

Ponga a prueba sus conocimientos

El verdadero dominio de la bioquímica se basa en aprender a aplicar su conocimiento y a resolver problemas. Cada capítulo concluye con un conjunto de problemas cuidadosamente diseñados que pondrán a prueba su comprensión de los principios básicos. Muchos de estos problemas son pequeños estudios de caso que presentan el problema en el contexto de un verdadero acertijo bioquímico.

A fin de practicar más, aparte de solucionar los ejercicios de repaso tradicionales en bioquímica, también hallará problemas adicionales en el sitio *Principles of Biochesmistry Companion Website* **(http://www.pearsoneducacion.net/horton).**

Aprenda a visualizar en 3-D

Los elementos bioquímicos son objetos tridimensionales. Comprender lo que sucede en una reacción bioquímica a nivel molecular requiere capacidad de "ver" lo que ocurre en tres dimensiones. En este libro se representan estructuras moleculares simples de diferentes formas con el fin de ilustrar su conformación tridimensional. Las estructuras de proteínas y los complejos proteínicos también se representan como objetos y dimensiones. A través de este libro encontrará muchos dibujos excelentes elaborados por un equipo experimentado de artistas. Además, en el sitio Web www.pearsoneducacion.net/horton encontrará numerosas animaciones y modelos moleculares interactivos que podrá manipular en tiempo real en una computadora. Se sugiere de manera especial que vea esas películas y realice los ejercicios que las acompañan, y que participe en los tutoriales de visualización molecular.

Retroalimentación

Por último, le agradeceremos que nos haga saber los errores y omisiones que encuentre cuando utilice este texto. Díganos qué le gustaría ver en la siguiente edición. Muchos de los cambios en esta cuarta edición se han originado de sugerencias y críticas por parte de estudiantes como usted. Con su ayuda, continuaremos haciendo evolucionar este trabajo para convertirlo en una herramienta más útil. Nuestros correos electrónicos se encuentran al final de este prefacio. ¡Buena suerte y disfrútelo!

Al profesor

Sean bienvenidos todos nuestros leales usuarios y aquellos profesores que, por primera vez, se encuentran impartiendo cursos de bioquímica. Este libro de texto está diseñado para estudiantes de cursos de un semestre, pero se vuelve cada vez más popular en los cursos de dos semestres. Esperamos que encuentre este libro ideal para su curso. Si tuviera cualquier comentario o duda, por favor póngase en contacto mediante nuestro correo electrónico.

El libro se diseñó especialmente para el estudiante principiante que toma un primer curso en este floreciente tema. Las partes 1 y 2 establecen una base sólida para el conocimiento químico que ayudará a los alumnos a entender, y no sólo a memorizar, la dinámica de los procesos metabólicos y genéticos. En estas secciones se asume que los estudiantes han tomado cursos previos en química general y orgánica, y que han adquirido un conocimiento rudimentario de la química orgánica de los ácidos carboxílicos, aminas, alcoholes y aldehídos. Aun así, los principales grupos funcionales y las propiedades químicas de cada tipo de biomolécula se explican detalladamente conforme se van presentando sus estructuras y funciones.

Enfoque en los principios

En esencia, existen dos clases de libros de texto de bioquímica: los de consulta y los que se utilizan para la enseñanza. Es difícil que un libro cubra ambas funciones, ya que ese cúmulo de detalles que el profesional busca es lo que entrampa al novicio que con trabajo se abre camino en este viaje. Este texto es, sin disculpa alguna, para la enseñanza. Fue diseñado para promover el entendimiento en el estudiante y

no es una enciclopedia de bioquímica. Este libro se enfoca firmemente en la enseñanza de los principios básicos, y cada principio está apoyado por ejemplos cuidadosamente seleccionados.

Enfoque en la química con biología rigurosa

Cuando escribimos este texto por primera vez, decidimos tomarnos el tiempo para explicar, en términos químicos, los principios que abordamos. Con ese fin, ofrecemos explicaciones químicas detalladas de la mayor parte de la química contenida en este texto, incluyendo sus mecanismos (los cuales le dicen a los estudiantes cómo y por qué suceden las cosas).

Aunque la química ha sido muy importante, también le hemos dado ese nivel de importancia a la parte *bio* en la *bioquímica*. Puntualizamos que los sistemas bioquímicos evolucionan y que las reacciones que ocurren en algunas especies son variaciones de un tema más general. En esta edición, ponemos más énfasis en las similitudes de los sistemas procariotas y eucariotas, aunque evitamos realizar generalizaciones acerca de todos los organismos con base en reacciones que ocurren en unos pocos.

Estamos orgullosos de que éste es el libro de bioquímica más preciso desde el punto de vista científico. Nos hemos esforzado en asegurar que nuestros datos sean correctos y que las explicaciones de los conceptos básicos reflejen el consenso moderno entre investigadores activos. El éxito se debe, en gran parte, a la dedicación de muchos de nuestros revisores y editores.

Un enfoque en lo visual

La bioquímica es una ciencia tridimensional. La inclusión de imágenes de vanguardia generadas por computadora tiene la intención de esclarecer la forma y la función de las moléculas, y permitir que los estudiantes aprecien la relación entre la estructura y la función. La mayor parte de las imágenes de proteínas en esta edición son nuevas; fueron preparadas diestramente por Jonathan Parrish de la University of Alberta.

Para los estudiantes que tengan acceso a una computadora, ofrecemos muchas otras oportunidades. Hemos incluido los números de referencia del Banco de Datos de Proteínas (PDB, por sus siglas en inglés) para las coordenadas de las cuales se derivan todas las imágenes de las proteínas. Esto permite explorar por cuenta propia las estructuras con más profundidad. Además, tenemos una galería de archivos PDB que los estudiantes pueden ver utilizando Chime o cualquier otro visor molecular; se publican en el sitio Web Companion (**http://www.pearsoneducacion.net/horton**) como animaciones de los procesos dinámicos clave, así como tutoriales de visualización que utilizan Chime.

Organización

Nos hemos esforzado en presentar la historia de la bioquímica en forma clara, coherente y bien integrada, y en construir cada etapa del conocimiento necesaria para la siguiente etapa. Este libro está distribuido en cuatro partes, y cada una se basa en la que se presentó con anterioridad.

La parte uno constituye una introducción para todo lo siguiente. En el capítulo 1 se agregaron secciones acerca de termodinámica y cinética de reacción como respuesta a las sugerencias de sus colegas. Estas breves descripciones ayudarán a los estudiantes que necesitan repasar los principios químicos básicos. El capítulo 1 también incluye una breve reseña de la estructura celular y de las cuatro clases de macromoléculas: proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos. En este capítulo, y través del libro, conservamos un patrón coherente de presentación, desde la química básica hasta la función bioquímica. En primer lugar se muestra la química de las unidades monoméricas y después se exploran las propiedades y funciones de los biopolímeros y agregados formados a partir de esos monómeros: aminoácidos

en proteínas, monosacáridos en polisacáridos y glicoconjugados, lípidos en membranas, nucleótidos en ácidos nucleicos.

La parte dos incluye tres capítulos acerca de las propiedades de las enzimas, mecanismos enzimáticos y coenzimas (capítulos 5, 6, 7). Lo animamos a que adquiera una firme comprensión de estos temas críticos, dado que son necesarios para una apreciación posterior de la función de las enzimas y las coenzimas en las rutas metabólicas. El capítulo 8 cubre el tema de los carbohidratos y sus derivados. Se ha agregado nueva información acerca de los grupos sanguíneos ABO en la sección de glucoproteínas. Los lípidos y las membranas se describen en el capítulo 9, y aquí se presenta a los estudiantes el emocionante campo de la transducción de señal. Se mejoró la descripción del transporte de membrana y los potenciales de membrana con el fin de preparar a los estudiantes para los capítulos acerca del transporte de electrones y de gradientes protónicos.

La parte tres presenta nueve capítulos que se enfocan en las rutas metabólicas. En el capítulo 10 se presentan las intrincadas sinfonías moleculares del metabolismo mediante la consideración de cómo se energizan, interrelacionan y regulan las rutas. En esta edición se agregaron nuevos materiales acerca de cómo evolucionan las rutas metabólicas —un tema al que regresaremos en los capítulos subsiguientes. El capítulo 11 describe la glicólisis con todo detalle. En esta etapa se estableció un formato que aparece en los capítulos metabólicos siguientes: primero se describe la ruta básica en términos químicos y enzimáticos, después se demuestran los requerimientos energéticos y las fuentes de energía, y se concluye con un recuento de los mecanismos reguladores. Obsérvese que la primera introducción a la transducción de señal (capítulo 9) permite la integración de la regulación a cada capítulo del metabolismo y el análisis de flujo a través de las rutas recíprocas.

El capítulo 12 se ha reorganizado por completo. Ahora se pone mayor énfasis en la gluconeogénesis y se explica cómo se relacionan las rutas de la glicólisis y la gluconeogénesis. La mayoría de los profesores de bioquímica están dedicando más tiempo a la gluconeogénesis, dado que es la ruta fundamental en la mayoría de las especies. En los siguientes capítulos acerca del metabolismo de lípidos (capítulo 16), el metabolismo de aminoácidos (capítulo 17) y el metabolismo de los nucleótidos (capítulo 18) describimos las rutas de la biosíntesis antes de mostrar las rutas de degradación. Una vez más, esto es congruente con nuestro enfoque sobre los principios básicos de bioquímica que aplican a la mayoría de las especies y refleja una nueva tendencia en la enseñanza de la bioquímica. Siempre que ha sido posible, explicamos dónde difieren las rutas de la bioquímica humana de las que se pueden ver en otras especies.

Esperamos que disfrute el nuevo contenido del capítulo 13 (El ciclo del ácido cítrico) y del capítulo 14 (Transporte de electrones y síntesis de ATP). Se ha puesto mayor énfasis en la evolución de estas rutas y en la relación entre las versiones procariota y eucariota. También se han incorporado nuevas estructuras de complejos de membrana como parte de una estrategia para relacionar la estructura y la función de una forma más significativa de lo que era posible en ediciones previas. La parte tres también incluye un capítulo completamente revisado acerca de la fotosíntesis (capítulo 15). Se ha aprovechado la tremenda cantidad de nueva información acerca de la fotosíntesis para describir de qué manera los sistemas bacterianos simples han evolucionado en los sistemas de plantas más complejos. También se ha puesto mayor atención en la integración de los principios de la fotosíntesis y el material sobre la teoría quimiosmótica que se presenta en el capítulo precedente acerca del transporte de electrones.

La parte cuatro concluye el libro con cinco capítulos acerca del flujo de información biológica. Nuestro principal énfasis a través de esta serie de capítulos se encuentra en los procesos básicos que rigen las rutas de los flujos de información. Nos hemos esforzado en incorporar en nuestra historia de los genes y de la expresión genética los principios de bioquímica que se enseñaron en los capítulos precedentes. El capítulo final (23) es una presentación sustancial y contemporánea de las técnicas que se utilizan en la tecnología del ADN recombinante.

Nuevas características en esta edición

Estamos agradecidos por toda la información recibida relacionada con las primeras tres ediciones de este texto. Además de los cambios que se observaron, en esta cuarta edición podrá percatarse de las siguientes mejoras:

- descripciones ampliadas de las reacciones de oxidorreducción en varios capítulos, incluyendo una mayor explicación de dónde provienen los electrones.
- problemas adicionales al final de cada capítulo, con soluciones detalladas para todos los problemas en un apéndice al final del libro.
- más soluciones muestra a los problemas.
- mayor cantidad de referencias cruzadas al margen para mejorar la conexión entre los conceptos y la integración del material, a fin de permitir a los profesores cubrir el material en un orden diferente, y mejorar la eficiencia del estudio de sus alumnos.
- adición de un tema especial, aplicación clínica, e insertos de estudio más profundo en la mayor parte de los capítulos.
- insertos adicionales acerca de los orígenes de los nombres bioquímicos con el fin de hacer del vocabulario algo más sencillo e interesante.
- ampliación del glosario de términos bioquímicos al final del libro.
- actualización de lecturas seleccionadas al final de cada capítulo.

Desde la publicación de la tercera edición se realizaron avances importantes en varias áreas. Para esta edición, cada sección del texto fue modificada para reflejar esos avances. Por ejemplo, se agregaron muchas estructuras proteínicas nuevas, cada una con referencias al Banco de Datos de Proteínas; se amplió el análisis de las estructuras de las proteínas (con más ejemplos); se profundizaron los comentarios acerca de las enzimas multifuncionales conocidas; se enfatizó más el tema de la evolución molecular; se mejoró el análisis del mecanismo de conservación de energía como ATP; se incorporaron los resultados de varias iniciativas del genoma, y se agregó nueva información acerca de la transcripción y traducción, incluyendo información sobre las estructuras del ribosoma y la RNA polimerasa.

Se creó un paquete de aprendizaje para el estudiante (disponible en inglés) que incluye lo siguiente:

- The Biochemistry Student Companion
- Sitio Web Companion

Los paquetes para el profesor (también en inglés) consisten en:

- Centro de recursos para el instructor en CD/DVD
- Curso precargado en nuestra plataforma educactiva en línea (CourseCompass).

Agradecimientos

Estamos agradecidos con muchos de nuestros talentosos y destacados revisores que ayudaron a dar forma a este libro.

Colaboradores que ayudaron en esta cuarta edición:

Revisores de precisión:

David Watt, University of Kentucky
Neil Haave, University of Alberta

Revisores de contenido:

Consuelo Álvarez, Longwood University
Marilee Benore Parsons, University of Michigan
Albert M Bobst, University of Cincinnati
Gary J. Blomquist, University of Nevada, Reno
Kelly Drew, University of Alaska, Fairbanks
Andrew Feig, Indiana University
Giovanni Gadda, Georgia State University
Donna L. Gosnell, Valdosta State University
Charles Hardin, North Carolina State University
Jane E. Hobson, Kwantlen University College
Ramji L. Khandelwal, University of Saskatchewan
Scott Lefler, Arizona State
Kathleen Nolta, University of Michigan
Jeffrey Schineller, Humboldt State University
Richard Shingles, Johns Hopkins University
Michael A. Sypes, Pennsylvania State University
Martin T. Tuck, Ohio University
Julio F. Turrens, University of South Alabama
David Watt, University of Kentucky
James Zimmerman, Clemson University

Revisores que han contribuido en ediciones previas:

Lawrence Aaronson, Utica College of Syracuse; Stephen L. Bearne, University of North Carolina at Chapel Hill; Robert Bergen, University of Central Arkansas; Gary J. Blomquist, University of Nevada-Reno; Robert I. Bolla, Saint Louis University; Lori Bolyard, University of Evansville; John Brosnan, Memorial University of Newfoundland; Ronald Callahan, New York University; Martin F. Chaplin, South Bank University; William Coleman, University of Hartford; Harold Cook, Dalhousie University; Gary W Daughdrill, University of Idaho; Ruthellen M. Dawley, University of Evansville; John Durham, West Virginia School of Medicine; Yves Engelborghs, University of Leuven; Edward Funkhouser, Texas A&M University; Milton Gordon, University of Washington; Kenneth, E. Guyer, Marshall University; Robert Harris, Indiana University-School of Medicine; Jan Hoek, Thomas Jefferson University; J. Kenneth Hoober, Arizona State University; Cristi Hunnes, Rocky Mountain College; Mahendra K. Jain, University of Delaware; Thomas D. Kim, Youngstown State University; David Koetje, SUNY-Fredonia; James A. Knopp, North Carolina State University; Susan Lees-Miller, Roger A. Lewis, University of Nevada at Reno; University of Calgary; Robert N. Lindquist, San Francisco State University; Richard Lomneth, University of Nebraska at Omaha; Ray Lutgring, University of Evansville; George Marzluf, Ohio State University; Barbara Olson, University of Calgary; Thomas Prasthofer, Albany College of Pharmacy; Thomas Reilly, California State University-Dominguez Hills; Carl Rhodes, University of Illinois-Urbana-Champagne; Gale Rhodes, University of Southern Maine; Duane L. Rohlfing, University of South Carolina; Douglas Russell, Dalhousie University; Aziz Sancar, University of North Carolina-School of Medicine; Larry Scheve, California State University-Hayward; Allen Scism, Central Missouri State University; Steven Seifried, University of Hawaii at Manoa; Thomas Sherman, University of Pittsburgh; Timothy A. Sherwood, Arkansas Tech University; Dean Sherry, University of Texas at Dallas; David Skalnik, Indiana University School of Medicine; Anthony F. Sky, Lawrence Technological University; Gary D. Small, University of South Dakota; Ronald L. Somerville, Purdue University; Ralph Stephani, St. John's University; Laurence Tate, University of South Alabama; William Thompson, University of Toronto; Richard W. Topham, University of Richmond; Arrel Towes, University of South Carolina; Julio F. Turrens, University of South

Alabama; Jack Y. Vanderhoek, Charles Waechter, University of Kentucky; Jubran M. Wakim, Middle Tennessee State University; George Washington University; William Wolodko, University of Alberta; David Yang, Georgetown University.

También nos gustaría agradecer a nuestros colegas que contribuyeron anteriormente con el material de determinados capítulos, y cuyo cuidadoso trabajo aún reside en este libro:

Roy Baker, University of Toronto
Roger W. Brownsey, University of British Columbia
Willy Kalt, Agriculture Canada
Robert K. Murray, University of Toronto
Frances Sharom, University of Guelph
Malcolm Watford, Rutgers, The State University of New Jersey

Asimismo, nos gustaría agradecer a quienes brindaron su ayuda para integrar este libro, el cual supuso un gran esfuerzo de colaboración entre varios miembros del equipo que dio vida a este proyecto: Jonathan Parrish, Jay McElroy, Lisa Shoemaker, y los artistas de Prentice Hall; Jennifer Hart, asistente editorial, Crissy Dudonis, editor de proyecto a cargo de los suplementos, Patrick Shriner, editor de medios, Andrew Gilfillan, gerente de mercadotecnia, y nuestro especial agradecimiento a Marty Sopher, nuestro editor de producción, cuyas habilidades de organización han hecho posible la creación de este libro. También nos gustaría agradecer a Gary Carlson, editor ejecutivo en Prentice Hall.

Por último, cerramos con una invitación para la retroalimentación. A pesar de nuestros mejores esfuerzos (y del gigantesco historial de las ediciones previas), somos proclives a cometer errores en un libro de esta magnitud; sin embargo, estamos comprometidos a convertirlo en el mejor libro de bioquímica disponible; hacemos notar que todos sus comentarios siempre serán bienvenidos.

Laurence A. Moran
lamoran@bioinfo.med.utoronto.ca

K. Gray Scrimgeour
gray@scrimgeour.ca

Marc D. Perry
marc.perry@utoronto.ca

Guía sobre las características de este texto

La mayoría de los estudiantes que adquieran este libro tiene la meta de dominar el material. También desea obtener una buena calificación en el curso. He aquí algunos consejos que lo ayudarán a alcanzar esa finalidad:

- Asista a sus clases y tome notas.
- Manténgase al corriente en todas sus tareas.
- Lea este libro de texto según lo señale su profesor.
- Practique sus habilidades resolviendo problemas: muchos son parecidos a los que vendrán en sus exámenes.

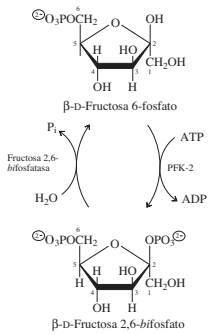


Figura 11.16 ▲
Interconversión de *β*-D-fructosa 6-fosfato y *β*-D-fructosa 2,6-*bi*fosfato.

La ruta de señalización con adenilil ciclasa se describió en la sección 9.12B.

como se describió en la sección 10.6, se presentan cambios importantes en las concentraciones de ADP y AMP, porque esas moléculas existen en las células en concentraciones mucho menores que la de ATP, y pequeños cambios en la concentración de ATP causan cambios proporcionalmente mayores en las concentraciones de ADP y AMP. En consecuencia, las concentraciones de estado estable de estos compuestos pueden controlar el flujo a través de la PFK-1.

El citrato, un intermedio en el ciclo del ácido cítrico, es un inhibidor de importancia fisiológica para la PFK-1. Una concentración elevada de citrato indica que el ciclo del ácido cítrico está bloqueado, y que no tendría objeto producir más piruvato. El efecto regulador del citrato sobre la PFK-1 es un ejemplo de inhibición por retroalimentación, que regula el abasto de piruvato al ciclo del ácido cítrico.

La actividad de la PFK-1 está regulada por el pH intracelular. Por ejemplo, durante el ejercicio pesado, la glicólisis anaeróbica produce ácido láctico en las células musculares. Si el ácido láctico no es eliminado con la rapidez suficiente por la sangre, baja el pH y se inhibe la PFK-1 por el exceso de iones hidrógeno.

La fructosa 2,6-*bis*fosfato (figura 11.16) es un activador potente de PFK-1, eficaz en los dominios micromolares. Este compuesto existe en los mamíferos, hongos y plantas, pero no en los procariotas.

La fructosa 2,6-*bis*fosfato se forma a partir de fructosa 6-fosfato, por acción de la enzima fosfofructocinasa-2 (PFK-2, o fructosa 6-fosfato, cinasa 2). La PFK-2 es estimulada por fosfato inorgánico e inhibida por citrato. En forma sorprendente, en el hígado de los mamíferos, un sitio activo diferente en la misma proteína es el que cataliza la desfosforilación hidrolítica de fructosa 2,6-*bi*fosfato para volver a formar fructosa 6-fosfato. Esta actividad de la enzima se llama fructosa 2,6-*bi*fosfatasa. Las actividades paralelas de la PFK-2 controlan la concentración de fructosa 2,6-*bi*fosfato en estado estable.

En el hígado, la actividad de la PFK-2 se vincula con la acción del glucagón, hormona producida en el páncreas como respuesta a concentraciones bajas de glucosa en la sangre. Una elevación en la concentración de glucagón en la sangre dispara la ruta de señalización de adenilil ciclasa en las células hepáticas, lo que culmina en la fosforilación de un residuo de serina en la PFK-2 (figura 11.17). La fosforilación desactiva la actividad de la cinasa, de la enzima bifuncional, y activa su actividad de fosfatasa. Bajo estas condiciones baja la concentración de fructosa 2,6-*bi*fosfato, la PFK-1 se vuelve menos activa y disminuye la glicólisis. Bajo las condiciones en las que la glucosa se metaboliza rápidamente, la concentración de glucagón baja, la concentración de fructosa 6-fosfato aumenta y se forma más fructosa 2,6-*bi*fosfato, ya que la fructosa 6-fosfato es un sustrato de PFK-2 y a la vez es un inhibidor potente de la fructosa 2,6-*bi*fosfatasa. Una fosfoproteína fosfatasa cataliza la desfosforilación de PFK-2. Así, en las células hepáticas se logra controlar la glicólisis mediante el glucagón, y la glucosa mediante el control de la enzima bifuncional cuya actividad establece la concentración de fructosa 2,6-*bi*fosfato en estado estable.

D. Regulación de piruvato cinasa

El tercer sitio de regulación alostérica de la glicólisis es la reacción catalizada por la piruvato cinasa. Hay presentes cuatro isozimas diferentes de piruvato cinasa en los tejidos de mamíferos. Las isozimas que se encuentran en hígado, riñón y glóbulos rojos producen una curva sigmoidal cuando se grafica la velocidad inicial en función de la concentración de fosfoenolpiruvato (figura 11.18a). Estas enzimas están activadas alostéricamente por la fructosa 1,6-*bi*fosfato (figura 11.19, página 350) y son inhibidas por ATP. En ausencia de fructosa 1,6-*bi*fosfato, las concentraciones fisiológicas de ATP inhiben casi por completo a la enzima aislada. La presencia de fructosa 1,6-*bi*fosfato, que probablemente sea el modulador más importante *in vivo*, hace desplazar la curva hacia la izquierda. Cuando hay suficiente fructosa 1,6-*bi*fosfato, la curva se vuelve hiperbólica. La figura 11.18a muestra que la actividad enzimática es mayor en presencia del activador alostérico para diversas concentraciones de sustrato. Recuérdese que el fructosa 1, 6-*bi*fosfato es el producto de la reacción catalizada por la PFK-1. Su concentración aumenta cuando se eleva la actividad de la PFK-1. Como la fructosa 1,6-*bi*fosfato activa a

▲ Explicaciones integrales de química

Existen miles de reacciones metabólicas en los humanos. Tal vez intente memorizarlas todas, pero en algún momento este recurso se agotará; sin embargo, lo más importante es que la memorización no le será de ayuda si se encuentra con algo que no haya visto antes.

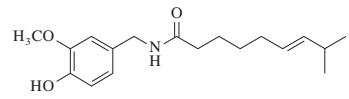
En este libro se muestran algunos de los mecanismos básicos de las reacciones catalizadas por enzimas: una extensión de lo que aprendió en química orgánica. Si entiende el mecanismo, también entenderá la química. Tendrá que memorizar menos, y retendrá la información de manera más efectiva.

Recuadros interesantes

La bioquímica es el fundamento de numerosas ciencias aplicadas, como medicina, ciencia forense, biotecnología y bioingeniería. Existen muchas historias interesantes que contar, y se encuentran en recuadros aparte del texto principal a fin de no distraerse del tema que se está estudiando. Estos recuadros le aportarán una comprensión de las aplicaciones comerciales, prácticas y médicas de la bioquímica.

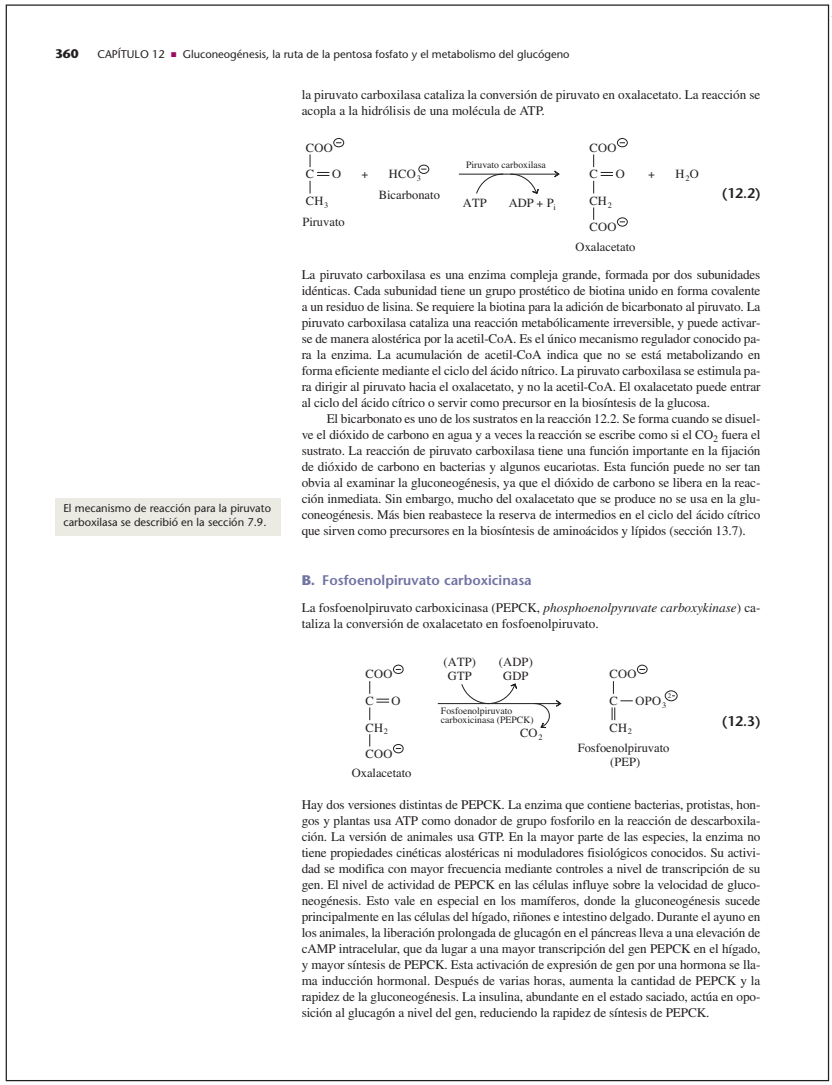
RECUADRO 9.5 Lo picante de los chiles

Hoy se sabe por qué el sabor de los "picantes" es así y causa un dolor quemante. El factor activo en los pimientos capsicum es un compuesto vainilloide lipofílico llamado capsaicina.



Capsaicina

Se ha identificado y caracterizado una proteína receptora de células nerviosas que responde a la capsaicina. Es un canal de iones, y su secuencia de aminoácidos parece indicar que tiene tres dominios transmembranales. La activación del receptor por capsaicina hace que el canal se abra, para que puedan pasar los iones de calcio y sodio a la célula nerviosa, y mandar un impulso al cerebro. El receptor no sólo se activa por especies vainilloides, sino también por rápidos aumentos de temperatura. De hecho, el papel *in vivo* probable del receptor es la detección de calor. Aunque la acción de los opioides suprime el dolor, la de los vainilloides produce dolor. El control del receptor de capsaicina puede ser valioso en el alivio del dolor crónico, en condiciones como la artritis.



360 CAPÍTULO 12 ▪ Gluconeogénesis, la ruta de la pentosa fosfato y el metabolismo del glucógeno

la piruvato carboxilasa cataliza la conversión de piruvato en oxalacetato. La reacción se acopla a la hidrólisis de una molécula de ATP.

(12.2)

La piruvato carboxilasa es una enzima compleja grande, formada por dos subunidades idénticas. Cada subunidad tiene un grupo prostético de biotina unido en forma covalente a un residuo de lisina. Se requiere la biotina para la adición de bicarbonato al piruvato. La piruvato carboxilasa cataliza una reacción metabólicamente irreversible, y puede activarse de manera alostérica por la acetil-CoA. Es el único mecanismo regulador conocido para la enzima. La acumulación de acetil-CoA indica que no se está metabolizando en forma eficiente mediante el ciclo del ácido nítrico. La piruvato carboxilasa se estimula para dirigir al piruvato hacia el oxalacetato, y no la acetil-CoA. El oxalacetato puede entrar al ciclo del ácido cítrico o servir como precursor en la biosíntesis de la glucosa.

El bicarbonato es uno de los sustratos en la reacción 12.2. Se forma cuando se disuelve el dióxido de carbono en agua y a veces la reacción se escribe como si el CO_2 fuera el sustrato. La reacción de piruvato carboxilasa tiene una función importante en la fijación de dióxido de carbono en bacterias y algunos eucariotas. Esta función puede no ser tan obvia al examinar la gluconeogénesis, ya que el dióxido de carbono se libera en la reacción inmediata. Sin embargo, mucho del oxalacetato que se produce no se usa en la gluconeogénesis. Más bien reabastece la reserva de intermedios en el ciclo del ácido cítrico que sirven como precursores en la biosíntesis de aminoácidos y lípidos (sección 13.7).

El mecanismo de reacción para la piruvato carboxilasa se describió en la sección 7.9.

B. Fosfoenolpiruvato carboxicinasa

La fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK, *phosphoenolpyruvate carboxykinase*) cataliza la conversión de oxalacetato en fosfoenolpiruvato.

(12.3)

Hay dos versiones distintas de PEPCK. La enzima que contiene bacterias, protistas, hongos y plantas usa ATP como donador de grupo fosforilo en la reacción de descarboxilación. La versión de animales usa GTP. En la mayor parte de las especies, la enzima no tiene propiedades cinéticas alostéricas ni moduladores fisiológicos conocidos. Su actividad se modifica con mayor frecuencia mediante controles a nivel de transcripción de su gen. El nivel de actividad de PEPCK en las células influye sobre la velocidad de gluconeogénesis. Esto vale en especial en los mamíferos, donde la gluconeogénesis sucede principalmente en las células del hígado, riñones e intestino delgado. Durante el ayuno en los animales, la liberación prolongada de glucagón en el páncreas lleva a una elevación de cAMP intracelular, que da lugar a una mayor transcripción del gen PEPCK en el hígado, y mayor síntesis de PEPCK. Esta activación de expresión de gen por una hormona se llama inducción hormonal. Después de varias horas, aumenta la cantidad de PEPCK y la rapidez de la gluconeogénesis. La insulina, abundante en el estado saciado, actúa en oposición al glucagón a nivel del gen, reduciendo la rapidez de síntesis de PEPCK.

Notas al margen

En bioquímica existe una abundancia de detalles, sin embargo deseamos que usted sea capaz de ver tanto el bosque como los árboles. Cuando necesite correlacionar algo que ya fue analizado en el texto, o algún tema que se abordará más adelante, lo encontrará en el margen. Las referencias a cuestiones anteriores le ofrecerán un repaso de conceptos que quizá ya haya olvidado. Las referencias a temas futuros le ayudarán a tener una percepción más general del tema.

Problemas de final de capítulo ▶

A partir del capítulo 2, se han incluido varios acertijos bioquímicos que se pueden resolver con base en la información contenida en el capítulo. Las respuestas se pueden encontrar al final del libro.

Problemas

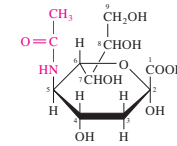
1. Identifique cada uno de los siguientes:
- a) Dos aldosas cuya configuración en los carbonos 3, 4 y 5 coincida con la D-fructosa.
- b) El enantiómero de la D-galactosa.
- c) Un epímero de la D-galactosa que también sea epímero de la D-manosa.
- d) Una cetosa que no tenga centros quirales.
- e) Una cetosa que sólo tenga un centro quiral.
- f) Residuos de monosacárido de celulosa, amilosa y glucógeno.
- g) Residuos monosacáridos de quitina.

2. Trace proyecciones de Fischer para: a) L-manosa, b) L-fucosa (6-desoxi-L-galactosa), c) D-xilitol y d) D-iduronato.

3. Describa las propiedades estructurales generales de los glicosaminoglicanos.

4. La miel es una emulsión de D-fructosa microcristalina y D-glucosa. Aunque la D-fructosa en polisacáridos existe principalmente en la forma de furanosa, la D-fructosa en solución o cristalina (como en la miel) es una mezcla de varias formas, donde predomina la β-D-fructopiranosa (67%) y la β-D-fructofuranosa (25%). Trace la proyección de Fischer para la D-fructosa e indique cómo puede ciclarse y formar los dos ciclos anteriores.

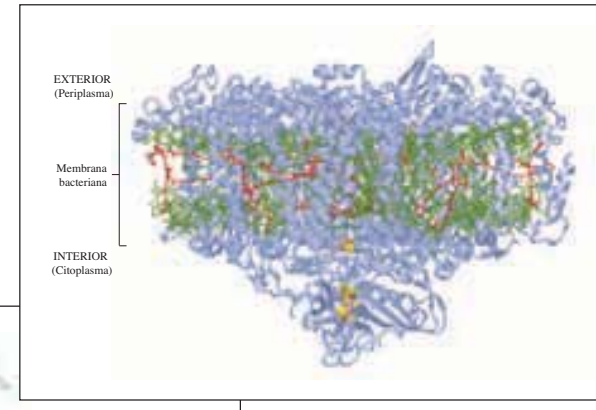
5. El ácido siálico (ácido *N*-Acetil-α-D-neuramínico) se encuentra con frecuencia en oligosacáridos *N*-enlazados, que intervienen en interacciones entre células. Las células cancerosas sintetizan cantidades mucho mayores de ácido siálico que las células normales, y se han propuesto derivados del ácido siálico como agentes anticancerosos para bloquear las interacciones en superficies celulares de las células normales y cancerosas. Conteste lo siguiente, acerca de la estructura del ácido siálico:
- a) ¿Es una forma anomérica α o β?
- b) ¿Tendrá el ácido siálico mutarrotación entre las formas anoméricas α y β?
- c) ¿Es un "desoxi" azúcar?
- d) ¿Formará la cadena abierta del ácido siálico un aldehído o una cetona?
- e) ¿Cuántos carbonos quirales hay en el anillo de azúcar?

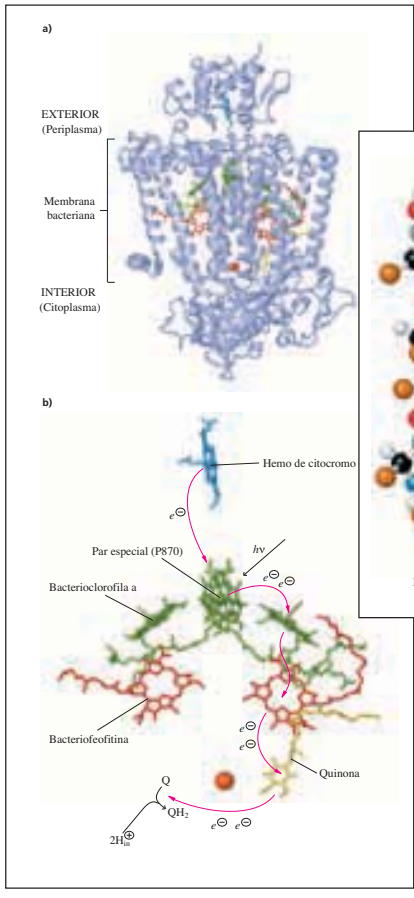


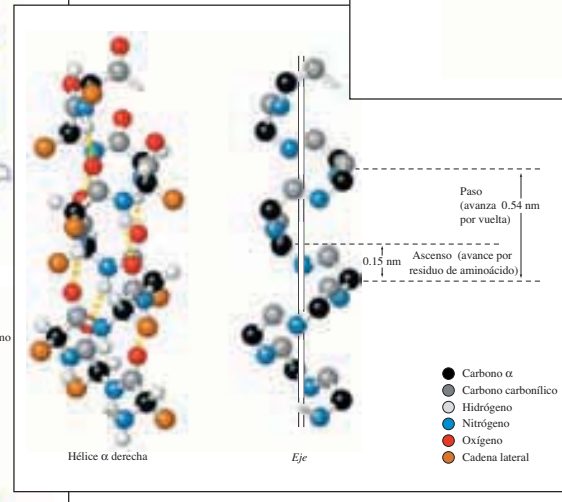
Ácido siálico

6. ¿Cuántos estereoisómeros son posibles para la glucopiranosa y la fructofuranosa? ¿Cuántos son azúcares D en cada caso, y cuántos son azúcares L?

7. Trace la estructura de cada una de las moléculas siguientes, e indique con un asterisco los carbonos quirales.
- a) Fosfato de α-D-glucosa.
- b) 5-Fosfato de 2-desoxi-β-D-ribosa.
- c) 3-Fosfato de D-gliceraldehído.
- d) L-Glucuronato.







▲ Figuras

La bioquímica es una ciencia tridimensional y hemos puesto gran énfasis en ayudarlo a visualizar conceptos abstractos y moléculas extremadamente pequeñas. Se han aprovechado las nuevas tecnologías de interpretación para elaborar figuras ilustrativas, tanto bellas como informativas. Para ilustraciones adicionales de moléculas en tercera dimensión diríjase al sitio Web **www.pearsoneducacion.net/horton** y vea los diferentes archivos PDB.

Sitio Web para el alumno (en inglés)

La nueva edición del libro de texto ofrece un sitio Web para el alumno en **www.pearsoneducacion.net/horton.** Este sitio está enfocado a la visualización de la bioquímica e incluye cientos de modelos tridimensionales de las biomoléculas, entre las que se encuentran casi todas las que aparecen en el texto. La posibilidad de ver estas ilustraciones es una forma maravillosa de asegurarse de que se comprenden las características clave de la arquitectura macromolecular.

El sitio Web también incluye los MediaLab, que le ayudarán a utilizar Internet a fin de practicar y aplicar lo que ha aprendido. Con cada laboratorio será capaz de investigar los antecedentes de un tema importante relacionado con el capítulo que acaba de leer, y después responderá las preguntas que ponen a prueba su comprensión del tema. Los temas MediaLab han sido cuidadosamente seleccionados para centrarse en la información oportuna y relevante en su vida cotidiana. Estas investigaciones están diseñadas para convertirse en una actividad dinámica de descubrimiento en la cual pueda participar y elaborar informes de manera individual o en grupo.

Recursos para el profesor (en inglés)

Banco de exámenes por William Coleman, University of Hartford y Donna Gosnell, Valdosta State University.
Ofrece una selección de más de 1,500 preguntas relacionadas con el texto.

Banco de exámenes en formato TestGen

Además del banco de exámenes impresos, también se ofrecen las preguntas de exámenes como parte del software de pruebas TestGen, un programa que permite a los profesores ver y editar las preguntas, exportar los exámenes, e imprimirlos en una variedad de formatos o incluso publicarlas en Web.

Además se ofrece al profesor las ilustraciones del libro, tanto en el formato JPG como en PowerPoint, lo cual facilita la preparación de las presentaciones para el salón de clase.

Todos estos recursos están disponibles para ser descargados desde Internet. Para mayor información, visite **www.pearsoneducacion.net/horton**

CourseCompass

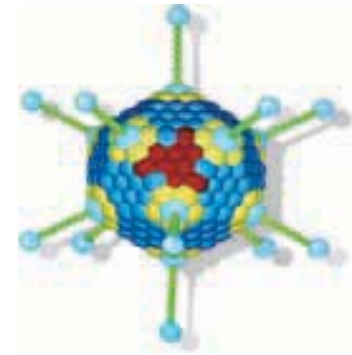
Este libro cuenta con un curso precargado en nuestra exclusiva plataforma educativa en línea, CourseCompass.

CourseCompass está basado en la plataforma Blackboard. Cada curso de CourseCompass está complementado con una serie de recursos que le permiten al profesor tener un curso funcionando en cuestión de minutos. El curso de este libro incluye cuestionarios de autoevaluación, animaciones, moléculas en tercera dimensión y vínculos hacia los MediaLabs. Por si fuera poco, CourseCompass permite a los profesores tener un seguimiento de las calificaciones de los alumnos y tener un sinnúmero de opciones de comunicación, entre las que se encuentran los foros de discusión, salones de conversación, envío de mensajes a varios usuarios y hasta un salón de clases virtual. Para mayor información sobre CourseCompass, pregunte a su representante de ventas o escríbanos a **editorialmx@pearsoneducacion.net.**

Principios de bioquímica

1

capítulo uno



Introducción a la bioquímica

La bioquímica es el estudio de las moléculas y las reacciones químicas de la vida. Es la disciplina que emplea los principios y el lenguaje de la química a fin de explicar la biología a nivel molecular. Los bioquímicos descubrieron que los compuestos químicos y los procesos metabólicos centrales son los mismos que se encuentran en organismos tan distantes como las bacterias, plantas y humanos. Se sabe que los principios básicos de la bioquímica son comunes a todos los organismos vivos. Aunque en la práctica los científicos concentran sus esfuerzos de investigación en organismos particulares, sus resultados se pueden extrapolar a muchas otras especies.

Este libro se ha titulado *Principios de bioquímica* debido a que se enfoca en los conceptos más importantes y fundamentales de la bioquímica: aquellos que son comunes a la mayoría de las especies, incluidas bacterias, plantas y mamíferos como el hombre. Cuando sea conveniente, se indicarán las características que distinguen a grupos particulares de organismos.

Muchos estudiantes e investigadores están cada vez más interesados en la bioquímica humana. Las causas de la enfermedad y la importancia de la nutrición apropiada, por ejemplo, son temas bioquímicos fascinantes. Los autores comparten ese interés, y es por ello que incluyeron numerosas referencias a la bioquímica humana en este libro de texto. No obstante, también tratarán de interesar al lector en el área de la bioquímica de otras especies. Con frecuencia es más fácil comprender los principios básicos de la bioquímica mediante el estudio de muchas especies diferentes para identificar temas y patrones comunes. Un conocimiento y apreciación de otras especies son de gran utilidad en el aprendizaje de la bioquímica. También ayudan a reconocer la naturaleza fundamental de la vida a nivel molecular y la forma en que las especies están relacionadas como consecuencia de la evolución de un ancestro común. Quizá las ediciones futuras de este libro incluirán capítulos referentes a la bioquímica de la vida en otros planetas. Hasta entonces, habrá que conformarse con aprender acerca de la diversidad de la vida en este planeta.

Este capítulo de introducción dará inicio con algunos puntos de interés en la historia de la bioquímica, seguidos por algunas breves descripciones de los grupos químicos y moléculas que se encontrarán en el transcurso de este libro. La segunda mitad del ca-

Arriba: Adenovirus. Los virus están compuestos por una molécula de ácido nucleico rodeada por una capa de proteínas.

▲ Friedrich Wöhler (1800-1882). Al sintetizar la urea, Whöler demostró que los compuestos que se encuentran en los organismos vivos se pueden producir en el laboratorio a partir de sustancias inorgánicas.

pítulo es un repaso general de la estructura celular, cuyo fin es preparar al lector para el estudio de la bioquímica.

1.1 La bioquímica es una ciencia moderna

La bioquímica surgió como ciencia dinámica tan sólo desde hace 100 años. No obstante, las bases para el campo de trabajo que dieron pie al surgimiento de la bioquímica como ciencia moderna fueron sentadas desde hace muchos siglos. El periodo anterior al siglo XX fue testigo de rápidos avances en la comprensión de los principios químicos básicos como la cinética de reacción y la composición atómica de las moléculas. Para fines del siglo XIX se habían identificado numerosas sustancias químicas producidas por los organismos vivos. Desde entonces, la bioquímica se ha convertido en una disciplina organizada y los bioquímicos dilucidaron muchos de los procesos químicos de la vida. El crecimiento de la bioquímica y su influencia en otras disciplinas seguirá su marcha durante el siglo XXI.

En 1828, Friedrich Wöhler sintetizó el compuesto orgánico urea al calentar el compuesto inorgánico cianato de amonio.

$$NH_4(OCN) \xrightarrow{\text{Calor}} H_2N-\overset{\displaystyle O}{\overset{\|}{C}}-NH_2 \qquad \textbf{(1.1)}$$

Este experimento mostró por primera vez que a partir de sustancias inorgánicas comunes era posible sintetizar los compuestos que se encuentran exclusivamente en los organismos vivos. Ahora se sabe que la síntesis y degradación de las sustancias biológicas obedecen a las mismas leyes químicas y físicas aplicables a procesos independientes de la biología. No se requieren procesos especiales o "vitalistas" para explicar la vida a nivel molecular. Muchos científicos ubican los principios de la bioquímica con la síntesis de la urea que realizó Friedrich Wöhler; sin embargo, tuvieron que transcurrir otros 75 años antes de que los primeros departamentos de bioquímica se establecieran en las universidades.

Los dos descubrimientos más importantes en la historia de la bioquímica son especialmente notables: el descubrimiento de la función catalítica de las enzimas y la función de los ácidos nucleicos como moléculas transportadoras de información. El gran tamaño de las proteínas y los ácidos nucleicos dificultó su caracterización inicial debido a las técnicas disponibles en la primera parte del siglo XX. Con el desarrollo de la tecnología moderna, ahora se tiene acceso a una gran cantidad de información acerca del modo como se relacionan las estructuras de las proteínas y los ácidos nucleicos con sus funciones biológicas.

El primer descubrimiento —la identificación de las enzimas como catalizadores de reacciones biológicas— fue en parte resultado de la investigación de Eduard Buchner. En 1897, Eduard Buchner demostró que los extractos de levaduras libres de células podían catalizar la fermentación de la glucosa para convertirla en alcohol y dióxido de carbono. Antes de esto, los científicos creían que sólo las células vivas podían catalizar tales reacciones biológicas complejas.

El estudio de la naturaleza de los catalizadores biológicos fue investigada por Emil Fischer, un contemporáneo de Eduard Buchner. Fischer estudió el efecto catalítico de las enzimas de la levadura en una reacción simple, la hidrólisis (ruptura por agua) de la sacarosa (azúcar de mesa). Fischer propuso que durante la catálisis una enzima y su reactante, o sustrato, se combinaban para formar un compuesto intermedio. También propuso que sólo una molécula con una estructura adecuada podía servir como sustrato de una determinada enzima. Fischer describió las enzimas como moldes rígidos, o cerraduras, y a los sustratos como sus llaves correspondientes. Pronto los investigadores comprendieron que casi todas las reacciones de la vida eran catalizadas por enzimas; por ende, la teoría modificada de la llave y su cerradura de la acción enzimática sigue siendo el principio central de la bioquímica moderna.

Como se verá en el capítulo 5, la catálisis enzimática permite rendimientos muy altos con muy pocos subproductos, en el caso de haberlos. En contraste, muchas reacciones catalizadas en la química orgánica se consideran aceptables si obtienen rendimientos de 50 a 60%. Las reacciones bioquímicas deben ser eficientes dado que los

▲ Eduard Buchner (1860-1917). Buchner descubrió la fermentación en ausencia de células.

subproductos pueden ser tóxicos para las células y su formación desperdiciaría energía preciosa. Por supuesto, la otra propiedad clave de la catálisis enzimática es que las reacciones biológicas ocurren con mucha mayor rapidez que sin un catalizador.

La última mitad del siglo XX presenció tremendos avances en el área de la biología estructural, en especial en lo referente a la estructura de las proteínas. En las décadas de 1950 y 1960, científicos de la Universidad de Cambridge (Reino Unido) dirigidos por John C. Kendrew y Max Perutz explicaron las primeras estructuras de las proteínas. Desde entonces, se han determinado las estructuras tridimensionales de más de 1,000 proteínas diferentes y la comprensión de la compleja bioquímica de las proteínas se ha incrementado de manera significativa. Estos rápidos avances fueron posibles gracias al acceso a computadoras más grandes y rápidas, y a nuevos programas de computación capaces de realizar los numerosos cálculos que antes se acostumbraba efectuar a mano o por medio de calculadoras sencillas. Gran parte de la bioquímica moderna depende de las computadoras, por lo que se ha creado una nueva subdisciplina denominada bioinformática.

El segundo gran descubrimiento en la historia de la bioquímica —la identificación de los ácidos nucleicos como moléculas de información— se suscitó medio siglo después de los experimentos de Fischer y Buchner. En 1944, Oswald Avery, Colin MacLeod y Maclyn McCarty extrajeron ácido desoxirribonucleico (ADN) de una cepa tóxica de la bacteria *Streptococcus pneumoniae* y lo mezclaron con una cepa no tóxica del mismo microorganismo. Como resultado, la cepa no tóxica se transformó de manera permanente en una cepa tóxica. Este experimento proporcionó la primera evidencia concluyente de que el ADN es el material genético. En 1953, James D. Watson y Francis H. C. Crick dedujeron la estructura tridimensional del ADN. La estructura del ADN sugirió de inmediato a Watson y Crick un método por el que el ADN pudiera reproducirse por sí mismo, o autorreplicarse, y por lo tanto transmitir información biológica a sus sucesivas generaciones. Las investigaciones posteriores demostraron que la información codificada en el ADN se transcribía al ácido ribonucleico (ARN) y después se traducía en la proteína.

$$\text{ADN} \longrightarrow \text{ARN} \longrightarrow \text{Proteína} \qquad \textbf{(1.2)}$$

El estudio de la genética en el contexto de las moléculas de ácido nucleico es parte de la biología molecular y, a su vez, la biología molecular es parte de la bioquímica. Con el fin de entender de qué forma los ácidos nucleicos almacenan y transmiten información genética, se debe comprender la estructura de los ácidos nucleicos y su función en la codificación de las enzimas, las cuales catalizan la síntesis y degradación de las biomoléculas, entre las que se encuentran también los ácidos nucleicos . El lector comprenderá que gran parte de su estudio de la bioquímica estará dedicado a considerar por qué las enzimas y los ácidos nucleicos son centrales para la química de la vida.

Como predijo Crick en 1958, el flujo normal de información del ácido nucleico a la proteína es irreversible. Él se refirió a este flujo de información unidireccional como el Dogma Central de la biología molecular. El término "Dogma Central" muchas veces es malentendido. En términos estrictos, no se refiere al flujo general de información al que antes se hizo referencia, sino al hecho de que una vez que la información en los ácidos nucleicos se transfiere a la proteína ésta no puede fluir de nuevo hacia los ácidos nucleicos.

▲ Emil Fischer (1852-1919). Fischer, quien realizó numerosas contribuciones para la comprensión de las estructuras y funciones de las moléculas biológicas, propuso la teoría de la cerradura y la llave de la acción enzimática. Recibió el premio Nobel de química en 1902 por sus investigaciones sobre el metabolismo de los azúcares y purinas.

La síntesis del ARN (trascripción) y de las proteínas (traducción) se describe en los capítulos 21 y 22, respectivamente.

1.2 Los elementos químicos de la vida

Existen seis elementos no metálicos —oxígeno, carbono, hidrógeno, nitrógeno, fósforo y azufre— que representan más de 97% del peso de la mayoría de los organismos. Todos estos elementos pueden formar enlaces covalentes estables. Las cantidades relativas de estos seis elementos varían en cada organismo. El agua es el principal componente de las células y representa un alto porcentaje (en peso) de oxígeno. El carbono es mucho más abundante en los organismos vivos que en el resto del universo. Por otro lado, algunos elementos como el silicio, el aluminio y el hierro son muy comunes en la corteza terrestre pero están presentes en las células sólo en trazas. En conjunto, un total de 29 elementos diferentes se encuentran por lo común en los organismos vivientes (figura 1.1, página 4). Éstos incluyen a cinco iones esenciales en todas las especies: calcio (Ca^{2+}), potasio (K^{+}), sodio (Na^{+}), magnesio (Mg^{2+}), y cloruro (Cl^{-}). Obsérvese que los 24 elementos adicionales representan sólo 3% del peso de los organismos vivos.

IA												IIIA	IVA	VA	VIA	VIIA	0
1 **H** 1.008	IIA																2 **He** 4.003
3 **Li** 6.941	4 **Be** 9.012											5 **B** 10.81	6 **C** 12.01	7 **N** 14.01	8 **O** 16.00	9 **F** 19.00	10 **Ne** 20.18
11 **Na** 22.99	12 **Mg** 24.31	IIIB	IVB	VB	VIB	VIIB	VIIIB			IB	IIB	13 **Al** 26.98	14 **Si** 28.09	15 **P** 30.97	16 **S** 32.07	17 **Cl** 35.45	18 **Ar** 39.95
19 **K** 39.10	20 **Ca** 40.08	21 **Sc** 44.96	22 **Ti** 47.87	23 **V** 50.94	24 **Cr** 52.00	25 **Mn** 54.94	26 **Fe** 55.85	27 **Co** 58.93	28 **Ni** 58.69	29 **Cu** 63.55	30 **Zn** 65.39	31 **Ga** 69.72	32 **Ge** 72.61	33 **As** 74.92	34 **Se** 78.96	35 **Br** 79.90	36 **Kr** 83.80
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 **Tc** (98)	44 **Ru** 101.1	45 **Rh** 102.9	46 **Pd** 106.4	47 **Ag** 107.9	48 **Cd** 112.4	49 **In** 114.8	50 **Sn** 118.7	51 **Sb** 121.8	52 **Te** 127.6	53 **I** 126.9	54 **Xe** 131.3
55 **Cs** 132.9	56 **Ba** 137.3	57 * **La** 138.9	72 **Hf** 178.5	73 **Ta** 180.9	74 **W** 183.8	75 **Re** 186.2	76 **Os** 190.2	77 **Ir** 192.2	78 **Pt** 195.1	79 **Au** 197.0	80 **Hg** 200.6	81 **Tl** 204.4	82 **Pb** 207.2	83 **Bi** 209.0	84 **Po** (209)	85 **At** (210)	86 **Rn** (222)
87 **Fr** (223)	88 **Ra** (226)	89** **Ac** (227)	104 **Rf** (261)	105 **Db** (262)	106 **Sg** (263)	107 **Bh** (264)	108 **Hs** (265)	109 **Mt** (268)	110 (269)	111 (272)	112 (277)	113	114 (285)	115	116 (289)	117	118 (293)

58* **Ce** 140.1	59 **Pr** 140.9	60 **Nd** 144.2	61 **Pm** (145)	62 **Sm** 150.4	63 **Eu** 152.0	64 **Gd** 157.3	65 **Tb** 158.9	66 **Dy** 162.5	67 **Ho** 164.9	68 **Er** 167.3	69 **Tm** 168.9	70 **Yb** 173.0	71 **Lu** 175.0
90** **Th** 232.0	91 **Pa** 231	92 **U** 238.0	93 **Np** (237)	94 **Pu** (244)	95 **Am** (243)	96 **Cm** (247)	97 **Bk** (247)	98 **Cf** (251)	99 **Es** (252)	100 **Fm** (257)	101 **Md** (258)	102 **No** (259)	103 **Lr** (262)

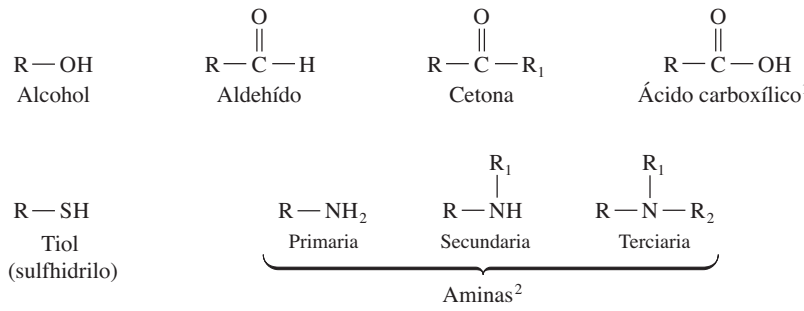
Figura 1.1▲
Tabla periódica de los elementos. Los elementos importantes encontrados en las células vivas se muestran a color. Los elementos en color rosa (CHNOPS) son los seis elementos más abundantes. Los cinco iones esenciales están en violeta. Los elementos traza se muestran en azul oscuro (más comunes) y en azul claro (los menos comunes). (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

La mayor parte del material sólido de las células está formado por compuestos que contienen carbono. El estudio de tales compuestos cae dentro del dominio de la química orgánica. Existe una coincidencia considerable entre las disciplinas de la química orgánica y la bioquímica, razón por la que es de gran utilidad un curso de química orgánica para entender la bioquímica. Los químicos orgánicos están más interesados en las reacciones que tienen lugar en el laboratorio, mientras que los bioquímicos se enfocan en comprender lo que ocurre en las reacciones dentro de las células vivas. Los tipos de compuestos orgánicos que se encuentran comúnmente en la bioquímica se muestran en la figura 1.2a.

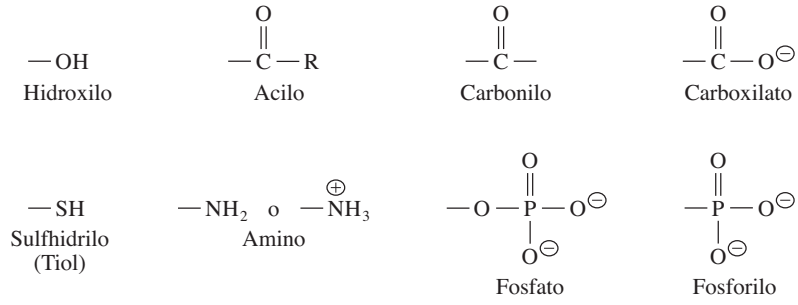
Las reacciones bioquímicas incluyen uniones químicas específicas o partes de moléculas denominadas grupos funcionales. Los más importantes sitios de reactividad se muestran en la figura 1.2b. La figura 1.2c ilustra algunos tipos de enlaces presentes en los derivados de compuestos que se muestran en la figura 1.2a. Obsérvese que todas estas uniones están compuestas por diferentes átomos y enlaces individuales entre átomos. Se estudiarán estos compuestos, grupos funcionales y uniones a lo largo de este libro. Los enlaces éster y éter son comunes en los ácidos grasos y los lípidos. Los enlaces amida se presentan en las proteínas. Los enlaces éster fosfato y fosfoanhídrido se presentan en los nucleótidos.

Una cuestión importante para la bioquímica es que las reacciones químicas que ocurren dentro de la célula son similares a las reacciones que tienen lugar en un laboratorio químico. La diferencia más importante radica en que casi todas las reacciones que ocurren en las células vivas son catalizadas por enzimas y por lo tanto ocurren a velocidades muy altas. Una de las principales metas de este libro es explicar la forma en que las enzimas aceleran las reacciones sin infringir los mecanismos de reacción fundamentales de la química orgánica. La eficiencia catalítica de las enzimas se puede observar incluso cuando las enzimas y los reactivos se aíslan en un tubo de ensayo. Con frecuencia, los investigadores encuentran útil distinguir entre las reacciones bioquímicas que tienen lugar en un organismo (*in vivo*) y aquellas que ocurren bajo condiciones de laboratorio (*in vitro*).

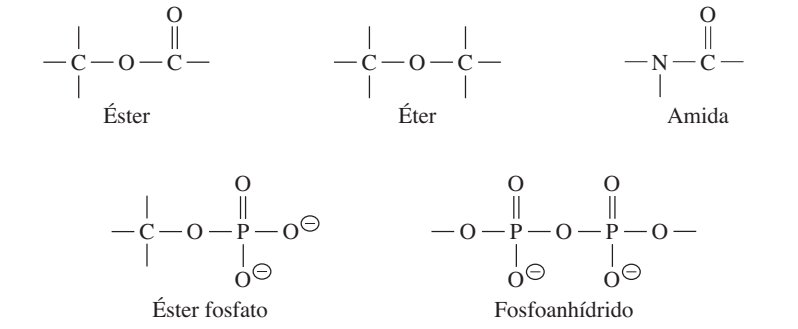
a) *Compuestos orgánicos*



b) *Grupos funcionales*



c) *Enlaces en compuestos bioquímicos*



◀Figura 1.2
Fórmulas generales de **a)** compuestos orgánicos, **b)** grupos funcionales y **c)** enlaces comunes en bioquímica. La R representa un grupo alquilo ($CH_3—(CH_2)_n—$).

[1] En la mayoría de las condiciones biológicas, los ácidos carboxílicos existen como aniones de carboxilato: $R—C(=O)—O^{\ominus}$

[2] En la mayoría de las condiciones biológicas, las aminas existen como iones amonio: $R—NH_3^{\oplus}$, $R—NH_2^{\oplus}—R_1$, y $R—NH^{\oplus}(—R_1)—R_2$

1.3 Muchas macromoléculas importantes son polímeros

Las estructuras químicas constituyen el vocabulario de la bioquímica. Se presentan algunas de estas estructuras a fin de preparar al lector para los ejemplos que encontrará en los siguientes capítulos. Gran parte de la bioquímica estudia moléculas muy grandes a las que se refiere como macromoléculas. Por lo general, las macromoléculas biológicas forman un polímero creado mediante la unión de muchas moléculas orgánicas más pequeñas, o monómeros, por medio de condensaciones (la remoción de los elementos del agua). Cada monómero incorporado a una cadena macromolecular se denomina residuo. En algunos casos, como en ciertos carbohidratos, un solo residuo se repite muchas veces; en otros casos, como en las proteínas y los ácidos nucleicos, una variedad de residuos están conectados en un orden particular. Cada residuo de un determinado polí-

mero, se va agregando mediante la repetición de la misma reacción catalizada por una enzima. Así, todos los residuos en una macromolécula son alineados en la misma dirección, y los extremos de la macromolécula son químicamente diferentes.

Las macromoléculas tienen propiedades que son muy diferentes de las de sus monómeros constitutivos. Por ejemplo, el almidón no es soluble en agua y no tiene un sabor dulce, a pesar de ser un polímero de la glucosa. Observaciones como ésta han llevado a la formulación del principio general de la organización jerárquica de la vida. Cada nivel de esta organización supone propiedades que no se pueden predecir con base únicamente en las del nivel anterior. Los niveles de complejidad, en orden creciente, son átomos, moléculas, macromoléculas, organelos, células, tejidos, órganos y organismos enteros. (Téngase en cuenta que muchas especies carecen de uno o más de estos niveles de complejidad. Los organismos unicelulares, por ejemplo, carecen de tejidos y órganos). Las siguientes secciones describen de manera sucinta los principales tipos de macromoléculas y de qué forma las secuencias de sus residuos o formas tridimensionales les confieren sus propiedades únicas.

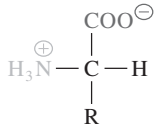
En el análisis de las moléculas y las macromoléculas, con frecuencia se hará referencia al peso molecular de un compuesto. Un término más preciso de peso molecular es *masa molecular relativa* (abreviada como M_r). Se trata de la masa de una molécula relativa a la 1/12 parte de la masa de un átomo del isótopo de carbono ^{12}C. (El peso atómico exacto de este isótopo se ha definido como de 12 unidades de masa atómica. Obsérvese que el peso atómico del carbono mostrado en la tabla periódica representa el promedio de varios isótopos diferentes, incluidos ^{13}C y ^{14}C). Debido a que M_r es una cantidad relativa es adimensional y no tiene unidades relativas a su valor. Por ejemplo, la masa molecular relativa de una proteína típica es 38,000 ($M_r = 38{,}000$). La masa molecular absoluta de un compuesto es de la misma magnitud que la del peso molecular salvo que está expresada en unidades llamadas daltons (1 dalton = 1 unidad de masa atómica). La masa molecular también se denomina masa molar debido a que representa la masa (medida en gramos) de 1 mol, o 6.023×10^{23} moléculas. La masa molecular de una proteína típica es de 38,000 daltons, lo que significa que 1 mol pesa 38 kg. La principal fuente de confusión es que el término "peso molecular" se ha convertido en un término muy utilizado en bioquímica aunque se refiera a masa molecular relativa y no a peso. Es un error común dar un peso molecular en daltons cuando debería ser adimensional. En la mayoría de los casos no se trata de un error significativo, pero es importante que el lector conozca la terminología correcta.

A. Proteínas

Son veinte los aminoácidos comunes que forman parte de las proteínas de todas las células. Cada aminoácido contiene un grupo amino y un grupo carboxilato, así como una cadena lateral (grupo R) que es única para cada aminoácido (figura 1.3a). Durante la síntesis de una proteína, el grupo amino de un aminoácido y el grupo carboxilato de otro se condensan para formar un enlace amida como se muestra en la figura 1.3b. La unión entre el átomo de carbono de un residuo de aminoácido y el átomo de nitrógeno del siguiente residuo se denomina enlace peptídico. La unión de extremo a extremo de muchos aminoácidos forma un polipéptido lineal que puede contener cientos de residuos de aminoácido. Una proteína funcional puede ser un solo polipéptido, o puede estar compuesta por varias cadenas de polipéptidos diferentes que están unidas fuertemente para formar una estructura más compleja.

Muchas proteínas funcionan como enzimas; otras son componentes estructurales de células y organismos. La forma tridimensional de una proteína está determinada en gran parte por la secuencia de sus residuos de aminoácidos. Esta información de secuencia se codifica en el gen para la proteína. La función de una proteína depende de su estructura tridimensional, o conformación. Se han determinado las estructuras de muchas proteínas y se han esclarecido varios principios que rigen la relación entre estructura y función. Por ejemplo, muchas enzimas contienen una hendidura, o ranura, que une los sustratos de una reacción. Esta cavidad contiene el sitio activo de la enzima —la región donde tiene lugar la reacción química. La figura 1.4a muestra la estructura de la enzima lisozima, la cual cataliza la hidrólisis de polímeros de carbohidratos. Reconózcase el

a)



b)

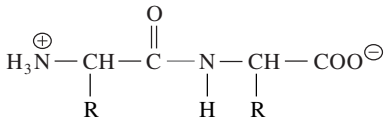


Figura 1.3▲
Estructura de un aminoácido y un dipéptido. **a)** Todos los aminoácidos contienen un grupo amino (gris claro) y un grupo carboxilato (gris oscuro). Diferentes aminoácidos contienen cadenas laterales diferentes (designadas –R). **b)** Un dipéptido se produce cuando un grupo amino de un aminoácido reacciona con el grupo carboxilato de otro para formar un enlace peptídico (gris oscuro).

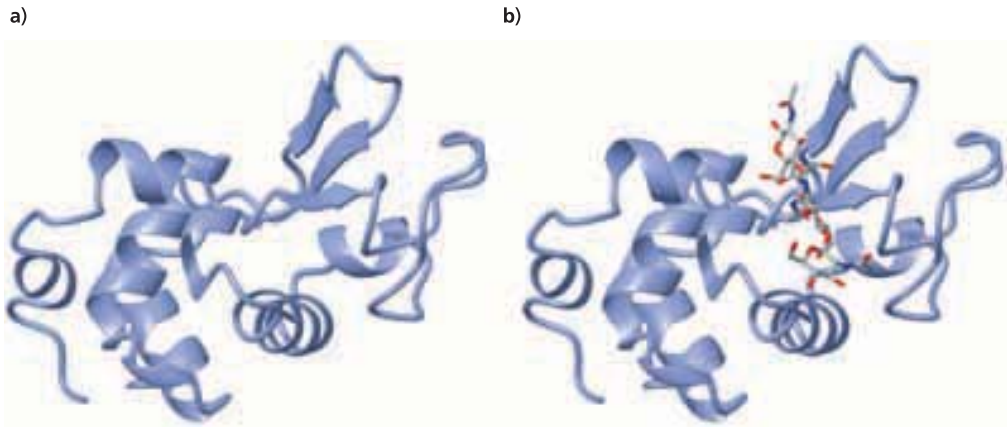


Figura 1.4 ▲
Lisozima de clara de huevo de gallina (*Gallus gallus*). **a)** Lisozima libre. Obsérvese la hendidura característica que contiene al sitio activo de la enzima. **b)** La lisozima unida al sustrato. [PDB 1LZC]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

surco tan marcado en la molécula. Este surco es el sitio de unión del sustrato y de la actividad enzimática. La figura 1.4b muestra la estructura de la enzima con la unión de sustrato en la hendidura. Se analizará la relación entre estructura de proteína y función con más profundidad en los capítulos 4 y 6.

Existen muchas formas de representar las estructuras tridimensionales de los biopolímeros como las proteínas. La molécula de proteína en la figura 1.4 se muestra como un dibujo donde la conformación de la cadena polipeptídica se representa como una combinación de cables, listones helicoidales y flechas amplias. Otros tipos de representaciones en los capítulos siguientes incluyen imágenes que muestran la posición de todos los átomos. Los programas de cómputo que crean estas imágenes son gratuitos en Internet, y los datos estructurales de las proteínas se pueden obtener en varios sitios de bases de datos. Con un poco de práctica, cualquier estudiante puede ver estas moléculas en un monitor de computadora.

B. Polisacáridos

Los carbohidratos, o sacáridos, están compuestos principalmente por carbono, oxígeno e hidrógeno. Este grupo de componentes incluye azúcares simples (monosacáridos) así como sus polímeros (polisacáridos). Todos los monosacáridos y los residuos de los polisacáridos contienen varios grupos hidroxilo y son por tanto polialcoholes. La mayoría de los monosacáridos comunes contiene ya sea cinco o seis átomos de carbono.

Las estructuras de los azúcares se pueden representar de varias formas. Por ejemplo, la ribosa (el azúcar de cinco carbonos más común) se puede mostrar como una molécula lineal con un contenido de cuatro grupos hidroxilo y un grupo aldehído (la figura 1.5a, página 8). Esta representación lineal se domina proyección de Fischer. Sin embargo, en su forma bioquímica más usual, la estructura de la ribosa es un anillo con un enlace covalente entre el carbono del grupo aldehído (C-1) y el oxígeno del grupo hidroxilo C-4, como se muestra en la figura 1.5b. La forma anular se muestra por lo común como proyección de Haworth (figura 1.5c). Esta proyección es una forma más precisa de representar la estructura real de la ribosa. La proyección de Haworth se gira 90° con respecto a la proyección de Fischer y retrata el anillo de carbohidrato como un plano con una esquina proyectada hacia fuera de la página (representada por líneas gruesas). No obstante, en realidad el anillo no es plano. Puede adoptar numerosas conformaciones en las cuales ciertos átomos anulares están fuera del plano. En la figura 1.5d, por ejemplo, el átomo C-2 de la ribosa descansa por encima del plano formado por el resto de los átomos anulares.

Algunas conformaciones son más estables que otras, así que la mayoría de las moléculas de ribosa se pueden representar por medio de una o dos de las diferentes conformaciones posibles. Empero, es importante reconocer que la mayoría de las moléculas bioquímicas existen como un conjunto de estructuras con diferentes conformaciones.

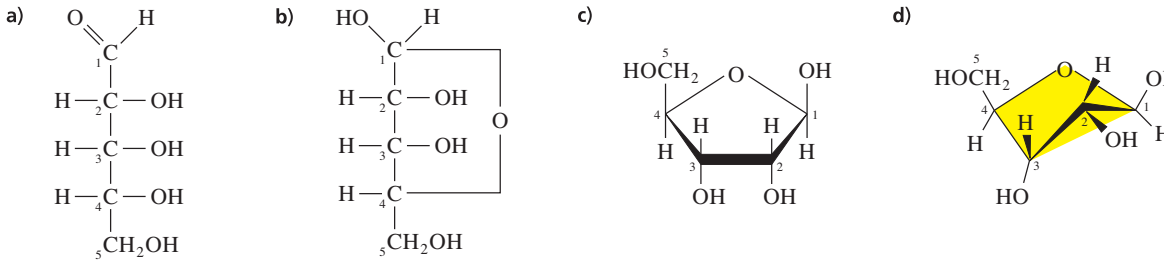


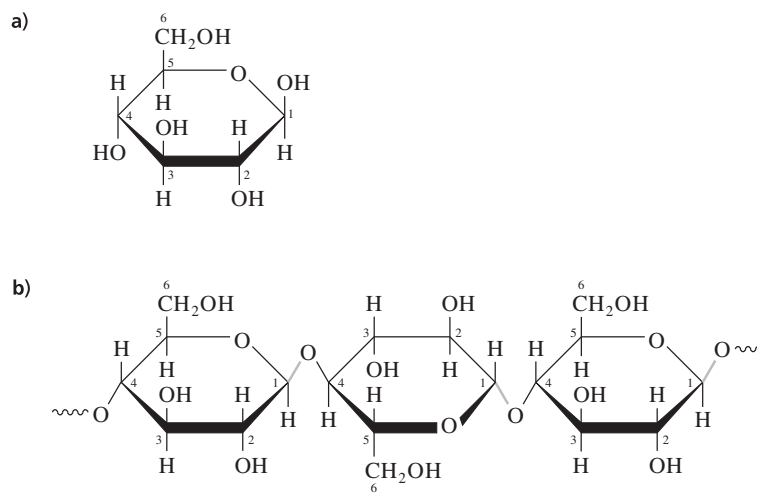
Figura 1.5 ▲
Representación de la estructura de la ribosa. **a)** En la proyección de Fischer, la ribosa se dibuja como una molécula lineal. **b)** En su forma bioquímica usual, la molécula de ribosa es un anillo, mostrado aquí como una proyección de Fischer. **c)** En una proyección de Haworth, el anillo se representa como perpendicular a la página (como se indica por las líneas gruesas, las cuales representan los enlaces más cercanos al observador). **d)** En realidad el anillo de ribosa no es plano y puede adoptar 20 posibles configuraciones en las cuales ciertos átomos anulares se ubican fuera del plano. En la conformación mostrada, C-2 descansa por encima del plano formado por el resto de los átomos anulares.

Las conformaciones de los monosacáridos se describen con más detalle en la sección 8.3.

Por definición, el cambio de una conformación a otra no requiere el rompimiento de algún enlace covalente. En contraste, las dos formas básicas de las estructuras de los carbohidratos, las formas lineales y las anulares, requieren el rompimiento y la formación de enlaces covalentes.

La glucosa es el azúcar de seis carbonos más abundante (figura 1.6a). Es la unidad monomérica de la celulosa, un polisacárido estructural, y del glucógeno y el almidón, los cuales son polisacáridos de almacenamiento. En estos polisacáridos, cada residuo de glucosa está unido en forma covalente al siguiente por un enlace covalente entre C-1 de una molécula de glucosa y uno de los grupos hidroxilo de la otra. Este enlace se denomina enlace glucosídico. En la celulosa, el C-1 de cada residuo de glucosa está unido al grupo hidroxilo C-4 del siguiente residuo (figura 1.6b). Los grupos hidroxilo en las cadenas adyacentes de celulosa interactúan de forma no covalente y crean fibras fuertes e insolubles. La celulosa quizá sea el biopolímero más abundante sobre la Tierra debido a que constituye un componente importante de los tallos de las plantas de floración, incluyendo los troncos de los árboles. Los carbohidratos se analizarán con mayor detalle en el capítulo 8.

Figura 1.6 ▶
Glucosa y celulosa. **a)** Proyección de Haworth de la glucosa. **b)** La celulosa, un polímero lineal de residuos de glucosa. Cada residuo está unido al siguiente mediante un enlace glucosídico (gris).



C. Ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos son grandes macromoléculas compuestas por monómeros llamados nucleótidos. El término *polinucleótido* constituye una descripción más exacta de una sola molécula de ácido nucleico, tal como *polipéptido* es un término más preciso que *proteína* para las moléculas individuales compuestas por residuos de aminoácidos. El término *ácido nucleico* se refiere al hecho de que estos polinucleótidos se detectaron por primera vez como moléculas acídicas en el núcleo de las células eucarióticas. Ahora se sabe que los ácidos nucleicos no están confinados a los núcleos eucarióticos y que son abundantes en el citoplasma y en los procariotas, que no tienen núcleo.

Los nucleótidos están compuestos por un azúcar de cinco carbonos, una base nitrogenada heterocíclica y al menos un grupo fosfato. En los ribonucleótidos, el azúcar es la ribosa; en los desoxirribonucleótidos, es la derivada desoxirribosa (figura 1.7). Las bases nitrogenadas de los nucleótidos corresponden a dos familias conocidas como purinas y pirimidinas. Las principales purinas son adenina (A) y guanina (G); las principales pirimidinas son citosina (C), timina (T) y uracilo (U). En un nucleótido, la base está unida al C-1 del azúcar, y el grupo fosfato está unido a uno de los demás carbonos del azúcar (por lo general, al C-5).

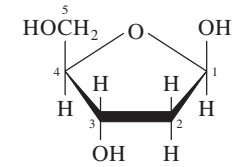


Figura 1.7▲
Desoxirribosa, el azúcar encontrado en los desoxirribonucleótidos. La desoxirribosa carece de un grupo hidroxilo en C-2.

La estructura del nucleótido adenosin trifosfato (ATP) se muestra en la figura 1.8. El ATP está compuesto por una parte de adenina unida a la ribosa mediante un enlace glucosídico. Existen tres grupos fosforilo (designados como α, β y γ) esterificados al grupo hidroxilo del C-5 de la ribosa. La unión entre ribosa y el grupo α-fosforilo es un enlace fosfoéster debido a que incluye un átomo de carbono y uno de fósforo, mientras que los grupos fosforilo β y γ en el ATP están conectados por enlaces fosfoanhídrido que no incluyen átomos de carbono. Todos los fosfoanhídridos poseen considerable energía química potencial y el ATP no es la excepción. Es el transportador central de la energía en las células vivientes. La energía potencial asociada con los enlaces entre los grupos fosforilo del ATP se puede utilizar directamente en reacciones bioquímicas o acoplarse a una reacción de una forma menos evidente. En las reacciones de condensación, por ejemplo, la transferencia de uno de los grupos fosforilos del ATP da como resultado la formación de un intermediario activado, que entonces participa en la reacción sintética. Se estudiarán muchas reacciones de condensación en las que interviene el ATP en el transcurso de este libro.

En los polinucleótidos, el grupo fosfato de un nucleótido está unido covalentemente al átomo de oxígeno C-3 del azúcar de otro nucleótido, con lo que se crea un segundo enlace fosfoéster. A la unión completa entre los carbonos de nucleótidos adyacentes se le denomina unión fosfodiéster debido a que contiene dos enlaces fosfoéster (figura 1.9, página 10). Los ácidos nucleicos contienen muchos residuos de nucleótido y les caracteriza un esqueleto que consiste en azúcares y fosfatos alternantes. En el ADN, las bases de dos hebras de polinucleótidos diferentes interactúan para formar una estructura helicoidal.

Existen varias formas de representar las estructuras de los ácidos nucleicos según las características que se deseen describir. El modelo de barras y esferas mostrado en la figura 1.10 de la siguiente página es ideal para ilustrar los átomos individuales y la estructura angular de los azúcares y bases. En este caso las dos hélices se pueden trazar siguiendo el esqueleto azúcar-fosfato enfatizado por la presencia de átomos de fósforo morados rodeados por cuatro átomos de oxígeno rojos. Los pares de bases individuales se ven insertos en el interior de la molécula. Se verán muchos otros modelos de ADN en el capítulo 19.

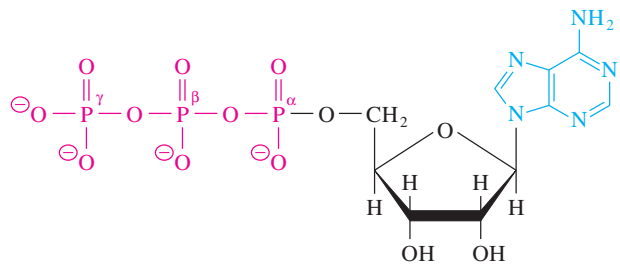
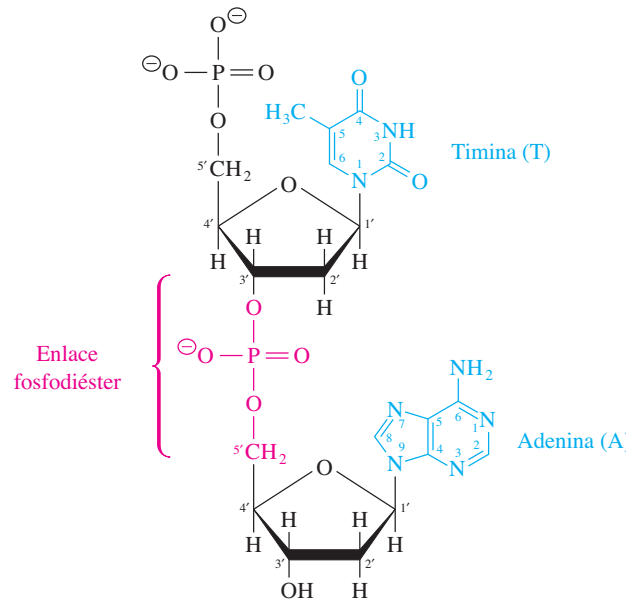

NH2
N
N
N
N
O
O
O

Figura 1.9 ▶
Estructura de un dinucleótido. Un residuo de desoxirribonucleótido contiene la pirimidina timina (parte superior) y el otro contiene la purina adenina (parte inferior). Los residuos están unidos por un enlace fosfodiéster entre las dos mitades de desoxirribosa. (Los átomos de carbono de la desoxirribosa están numerados con primas para distinguirlos de los átomos de las bases de timina y adenina).



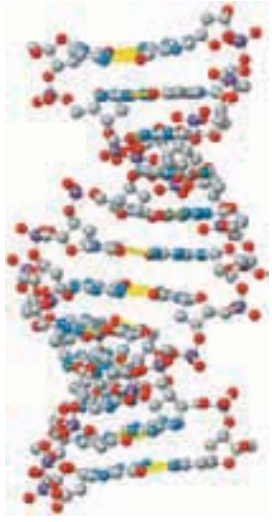


Figura 1.10▲
Segmento corto de una molécula de ADN. Dos diferentes polinucleótidos se asocian para formar una doble hélice. Las secuencias de pares de bases en el interior de la hélice transportan la información genética. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

El ARN contiene ribosa en lugar de desoxirribosa y por lo general es un polinucleótido de una sola hebra. Existen cuatro clases de moléculas de ARN. El ARN mensajero (ARNm) está implicado directamente en la transferencia de información del ADN a la proteína. El ARN de transferencia (ARNt) es una molécula más pequeña requerida para la síntesis de proteínas. El ARN ribosómico (ARNr) es el principal componente de los ribosomas. Las células también contienen una clase heterogénea de pequeños ARN que desempeñan una variedad de funciones diferentes. En los capítulos 19 a 22 se observará cómo difieren estas moléculas de ARN y cómo sus estructuras reflejan sus funciones biológicas.

D. Lípidos y membranas

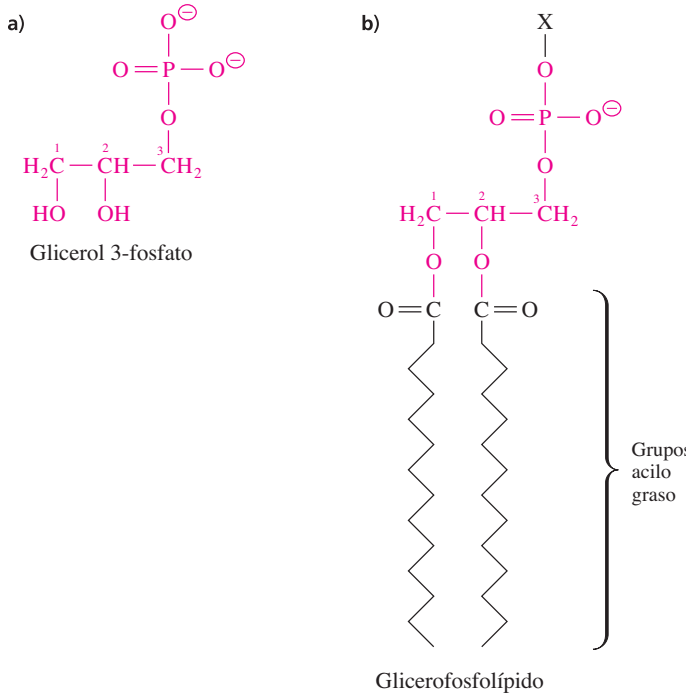
El término "lípido" se refiere a una clase diversa de moléculas ricas en carbono e hidrógeno pero que contienen relativamente pocos átomos de oxígeno. La mayor parte de los lípidos no es soluble en agua, pero se pueden disolver en algunos solventes orgánicos. Los lípidos más simples son los ácidos grasos, que son hidrocarburos de cadena larga con un grupo carboxilato en un extremo. De manera habitual los ácidos grasos se encuentran formando parte de moléculas más largas denominadas glicerofosfolípidos, los cuales contienen glicerol 3-fosfato y dos grupos grasos acilo (figura 1.11). Los glicerofosfolípidos son los principales componentes de las membranas biológicas.

Otros tipos de lípidos incluyen los esteroides y las ceras. El colesterol es un tipo de esteroide; se encuentra en las membranas de las células animales. Las ceras son comunes en plantas y animales, pero quizá los ejemplos más conocidos sean la cera de las abejas y el cerumen que se forma en los oídos.

Muchas veces los lípidos cuentan con una cabeza polar e hidrofílica (amante del agua) que puede interactuar con un entorno acuoso, y una cola no polar e hidrofóbica (temerosa del agua) (figura 1.12). En un entorno acuoso, las colas hidrofóbicas de tales lípidos se asocian para producir una hoja denominada bicapa lipídica. Las bicapas lipídicas forman la base estructural de todas las membranas biológicas. Las membranas separan a las células o compartimientos intracelulares de sus entornos al actuar como barreras impermeables a casi todos los compuestos solubles en agua. Las membranas son flexibles debido a que las bicapas lipídicas se estabilizan mediante fuerzas no covalentes.

Las membranas se encuentran entre las estructuras celulares más largas y complejas. En términos estrictos, las membranas no son polímeros sino agregados. Sin embargo, la asociación de moléculas lipídicas entre sí crea estructuras que exhiben propiedades que no muestran las moléculas componentes individuales. Su insolubilidad en agua y la flexibilidad de los agregados lipídicos confieren a las membranas biológicas muchas de sus características.

Las interacciones hidrofóbicas se analizan en el capítulo 2.



◀ Figura 1.11
Estructuras del glicerol 3-fosfato y un glicerofosfolípido. **a)** El grupo fosfato del glicerol 3-fosfato es polar. **b)** En un glicerofosfolípido, dos cadenas de ácidos grasos no polares están unidas al glicerol 3–fosfato a través de enlaces éster. La X representa un sustituyente del grupo fosfato.

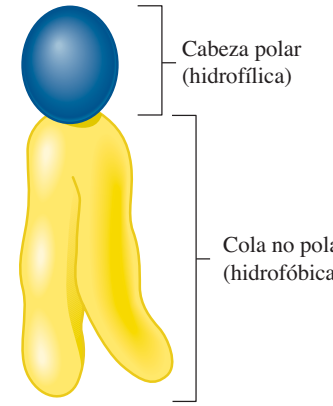


Figura 1.12 ▲
Modelo de un lípido de membrana. La molécula consiste en una cabeza polar (superior) y una cola no polar (inferior).

Las membranas biológicas también contienen proteínas, como se muestra en la figura 1.13. Algunas de estas proteínas de membrana sirven como canales para la entrada de nutrientes y la salida de desechos. Otras proteínas catalizan reacciones que ocurren específicamente en la superficie de las membranas. Existen sitios de muchas reacciones bioquímicas importantes. Las membranas lipídicas y biológicas se analizan con mayor detalle en el capítulo 9.

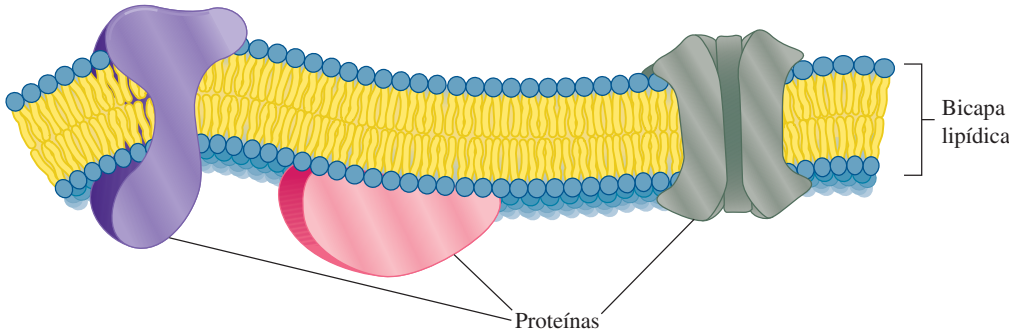
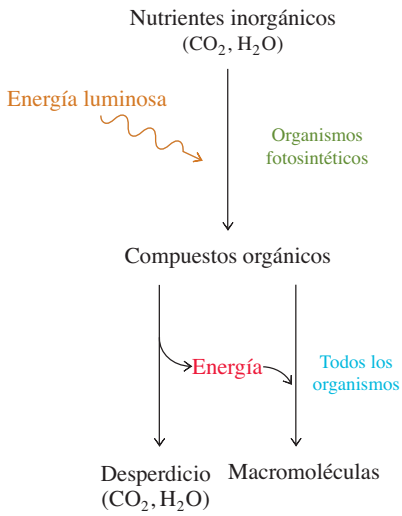


Figura 1.13 ▲
Estructura general de una membrana biológica. Las membranas biológicas están compuestas por una bicapa lipídica con proteínas asociadas. Las colas hidrofóbicas de las moléculas lipídicas individuales se juntan para formar el centro de la membrana. Las cabezas hidrofílicas están en contacto con el medio acuoso a cada lado de la membrana. La mayoría de las proteínas de membrana se extienden por la bicapa lipídica; otras están unidas a la superficie de diversas formas.

1.4 La energética de la vida

Las actividades de los organismos vivientes no dependen únicamente de las biomoléculas descritas en la sección anterior sino también de una multitud de moléculas más pequeñas y de iones que se encuentran en las células. La vida también requiere la entrada de energía. Los organismos vivientes transforman constantemente la energía en trabajo útil



▲ Flujo de energía. Los organismos fotosintéticos capturan energía de la luz solar y la utilizan para sintetizar compuestos orgánicos. La ruptura de estos compuestos tanto en los organismos fotosintéticos como no fotosintéticos genera la energía necesaria para la síntesis de las macromoléculas y de otros requerimientos celulares.

para sostenerse a sí mismos, para crecer y reproducirse. En última instancia, casi toda esta energía es proporcionada por el sol. La luz del sol es capturada por las plantas, algas y bacterias fotosintéticas y se utiliza para sintetizar compuestos biológicos. Los organismos fotosintéticos pueden ingerirse como alimento, y otros organismos como los protozoarios, hongos, bacterias no fotosintéticas y animales pueden descomponer sus moléculas constitutivas. Estos organismos no pueden convertir directamente la luz del sol en energía bioquímica útil. La descomposición de compuestos orgánicos tanto en organismos fotosintéticos como no fotosintéticos libera energía que se puede utilizar para impulsar la síntesis de nuevas moléculas y macromoléculas.

La fotosíntesis es uno de los procesos bioquímicos clave y esenciales para la vida, a pesar de que muchas especies, incluidos los mamíferos, se beneficien sólo indirectamente. Uno de los subproductos de la fotosíntesis es el oxígeno. Es muy probable que la atmósfera de la Tierra fue transformada por bacterias fotosintéticas productoras de oxígeno durante los primeros miles de millones de años de su historia (un ejemplo natural de terraformación). En el capítulo 15 se analiza el sorprendente conjunto de reacciones que capturan la luz del sol y la utilizan para sintetizar biopolímeros.

El término *metabolismo* se refiere a la gran cantidad de reacciones en virtud de las cuales los compuestos orgánicos se sintetizan y degradan y mediante el que la energía útil se extrae, almacena y utiliza. El estudio de los cambios en la energía durante las reacciones metabólicas se denomina *bioenergética*. La bioenergética es parte del campo de la termodinámica, una rama de la ciencia física que estudia los cambios energéticos. Los bioquímicos han descubierto que los principios básicos de la termodinámica que se aplican al flujo de energía en sistemas no vivos también son aplicables a la química de la vida. La termodinámica es un área compleja y de alta sofisticación. No se necesita dominar todas las complejidades y sutilezas que supone esta materia para entender cómo puede contribuir a la comprensión de la bioquímica. En este libro se evitan algunas de las complicaciones de la termodinámica a fin de concentrarse en utilizarla para describir algunos principios bioquímicos (analizados en el capítulo 10).

A. Velocidades de reacción y equilibrios

La velocidad, o aceleración, de una reacción química depende de la concentración de los reactivos. Considérese una reacción química simple donde la molécula A colisione con la molécula B y experimente una reacción que genere los productos C y D.

$$A + B \longrightarrow C + D \qquad \textbf{(1.3)}$$

La velocidad de esta reacción está determinada por las concentraciones de A y B. A altas concentraciones es probable que estos reactivos colisionen unos con otros, mientras que a bajas concentraciones la reacción puede tomar un largo tiempo. La concentración de una molécula en reacción estará indicada mediante su símbolo encerrado con corchetes. Así [A] significará "la concentración de A", por lo general expresada en moles por litro (M). La velocidad de la reacción es directamente proporcional al producto de las concentraciones de A y B. La velocidad puede describirse mediante una constante de proporcionalidad, k, que se denomina con más frecuencia constante de velocidad.

$$\text{velocidad} \propto [A][B] \qquad \text{velocidad} = k[A][B] \qquad \textbf{(1.4)}$$

Casi todas las reacciones bioquímicas son reversibles. Esto significa que C y D pueden colisionar y experimentar una reacción química para generar A y B. La velocidad de la reacción inversa depende de las concentraciones de C y D y esa velocidad se puede describir mediante una constante de velocidad diferente. Por convención, la constante de velocidad directa es k_1 y la constante de velocidad inversa es k_{-1}. La reacción 1.5 es una forma más exacta de representar la reacción mostrada en la reacción 1.3.

$$A + B \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} C + D \qquad \textbf{(1.5)}$$

Si se comienza una reacción en un tubo de ensayo mezclando altas concentraciones de A y B, entonces las concentraciones iniciales de C y D serán cero y la reacción

sólo se desarrollará de izquierda a derecha. La velocidad de la reacción inicial dependerá de las concentraciones iniciales de A y B y la constante de velocidad k_1. A medida que la reacción se desarrolle la cantidad de A y B disminuirá y la cantidad de C y D se incrementará. La reacción inversa comenzará a volverse considerable a medida que se acumulen los productos. La velocidad de la reacción inversa dependerá de las concentraciones de C y D y de la constante de velocidad k_{-1}.

En algún momento, las velocidades de las reacciones directa e inversa serán iguales y no habrá un cambio adicional en las concentraciones de A, B, C y D. En otras palabras, la reacción alcanzará el equilibrio. En el equilibrio,

$$k_1[\mathrm{A}][\mathrm{B}] = k_{-1}[\mathrm{C}][\mathrm{D}] \qquad \textbf{(1.6)}$$

En muchos casos, existe interés por conocer las concentraciones finales de los reactivos y los productos una vez que la reacción alcanza el equilibrio. La constante de equilibrio, K_{eq}, está definida por la relación entre las concentraciones de producto y las concentraciones de reactivo. La constante de equilibrio es también igual a la relación entre constantes de velocidad directa e inversa.

$$\frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[\mathrm{C}][\mathrm{D}]}{[\mathrm{A}][\mathrm{B}]} = K_{\mathrm{eq}} \qquad \textbf{(1.7)}$$

Las concentraciones de productos y reactivos pueden ser idénticas una vez que la reacción alcanza el equilibrio. En ese caso $K_{eq} = 1$ y las constantes de velocidad inversa y directa tienen los mismos valores. En la mayoría de los casos el valor de la constante de equilibrio varía de 10^{-3} a 10^3, lo cual significa que la velocidad de una de las reacciones es mucho más rápida que la otra. Si $K_{eq} = 10^3$ la reacción se desarrollará predominantemente hacia la derecha y las concentraciones finales de C y D serán mucho más altas que las concentraciones de A y B. En este caso la constante de velocidad directa (k_1) será 1000 veces mayor que la constante de velocidad inversa (k_{-1}). Esto significa que las colisiones entre C y D tienen mucho menos probabilidad de producir una reacción química que las colisiones entre A y B.

B. Termodinámica

Si se conocen los cambios de energía vinculados a una reacción o proceso es posible predecir las concentraciones en equilibrio. También se puede predecir la dirección de la reacción siempre que se conozcan las concentraciones iniciales de reactivos y productos. La cantidad termodinámica que proporciona esta información es la energía libre de Gibbs (G), llamada así por J. Willard Gibbs, quien describió por primera vez esta cantidad en 1878. Sucedió que las moléculas en disolución tenían una cierta energía que dependía de la temperatura, la presión, la concentración y otros estados. El cambio en la energía libre de Gibbs (ΔG) para una reacción es la diferencia entre la energía libre de los productos y la energía libre de los reactivos. El cambio global en la energía libre de Gibbs tiene dos componentes conocidos como cambio de entalpía (ΔH, el cambio en el contenido calorífico) y cambio de entropía (ΔS, el cambio en la aleatoriedad). Un proceso químico puede generar calor o absorberlo de sus alrededores. De manera similar, un proceso puede ocurrir con un incremento o disminución en el grado de desorden, o aleatoriedad, de los reactivos.

Existe mayor interés en saber si una determinada reacción va a suceder. En otras palabras, ¿la reacción será espontánea en ciertas condiciones? La espontaneidad de una reacción depende del cambio global en la energía libre de Gibbs, que se expresa como

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \qquad \textbf{(1.8)}$$

donde T es la temperatura en grados Kelvin. Cuando $\Delta G < 0$, la reacción es espontánea debido a que se libera energía. Cuando $\Delta G > 0$, la reacción requiere energía externa para desarrollarse y no sucederá de manera espontánea. Cuando $\Delta G = 0$, la reacción está en el equilibrio; las velocidades de las reacciones inversa y directa son idénticas, y con-

centraciones de productos y reactivos ya no cambian. Una serie de procesos vinculados, como las reacciones de una ruta metabólica en una célula, por lo general se desarrolla de manera espontánea sólo cuando está asociada con un cambio negativo en la energía libre de Gibbs. Es más probable que las reacciones bioquímicas o procesos se presenten a un grado mayor y con más rapidez cuando se relacionan con un incremento en la entropía y una disminución en la entalpía.

Si se conoce la energía libre de Gibbs de todos los productos y todos los reactivos es más sencillo calcular el cambio de la energía libre de Gibbs para una reacción mediante la ecuación 1.9.

$$\Delta G_{\text{reacción}} = \Delta G_{\text{productos}} - \Delta G_{\text{reactivos}} \qquad \textbf{(1.9)}$$

Por desgracia, con frecuencia las energías libres de Gibbs absolutas para todas las moléculas bioquímicas se desconocen. Lo que se conoce son los parámetros termodinámicos asociados con la *formación* de estas moléculas a partir de precursores simples. Por ejemplo, la glucosa se puede formar a partir del agua y del dióxido de carbono. No es necesario conocer los valores absolutos de la energía libre de Gibbs del agua y del dióxido de carbono para calcular la cantidad de entalpía y de entropía que se requiere para conjuntarlos y obtener glucosa. De hecho, lo que se puede medir es el calor liberado por la reacción inversa (descomposición de glucosa en dióxido de carbono y agua). Esto arroja el valor del cambio en la entalpía de formación de la glucosa (ΔH). El cambio en la entropía (ΔS) para esta reacción también se puede determinar. Es factible utilizar estas cantidades para determinar la energía libre de Gibbs de formación ($\Delta_f G$) para la glucosa. La energía libre de Gibbs de formación es la diferencia entre la energía libre absoluta de la glucosa y la del dióxido de carbono y agua.

Existen tablas que señalan estos valores de la energía libre de Gibbs para la formación de la mayoría de las moléculas biológicas. Se pueden utilizar para calcular el cambio en la energía libre de Gibbs para una reacción de la misma forma que se utilizan los valores absolutos en la ecuación 1.9.

$$\Delta G_{\text{reacción}} = \Delta_f G_{\text{productos}} - \Delta_f G_{\text{reactivos}} \qquad \textbf{(1.10)}$$

En este libro de texto se realizan frecuentes referencias al valor de $\Delta_f G$ como la energía libre de Gibbs de un compuesto dado que se puede utilizar con facilidad en cálculos como si fuera un valor absoluto. Existe una complicación adicional que no se ha mencionado. Para cualquier reacción, incluyendo la hidrólisis de la glucosa, el cambio en la energía libre real depende de las concentraciones de reactivos y productos. Considérese la reacción hipotética de la ecuación 1.3. Si se comienza con una cierta cantidad de A y B y ninguno de los productos C y D, entonces es obvio que la reacción sólo puede desarrollarse en una dirección, al menos al principio. En términos termodinámicos, $\Delta G_{\text{reacción}}$ es favorable en estas condiciones. Cuanto mayores sean las concentraciones de A y B, más probable será que la reacción ocurra. Éste es un asunto importante al que se hará constante referencia a medida que se avance en el estudio de la bioquímica —es decir, que el cambio real en la energía libre de Gibbs en una reacción depende de las concentraciones de reactivos y productos.

Lo que se necesita son algunos valores estándar de ΔG que puedan ajustarse para la concentración. Estos valores estándar son el cambio de energía libre de Gibbs medido en ciertas condiciones. Por convención, las condiciones estándar son a 25°C (298° K), presión estándar de 1 atm y una concentración de 1.0 M de todos los productos y reactivos. En la mayoría de las reacciones químicas la concentración de $H^{\oplus}$ es importante y se indica mediante el pH, como se describirá en el siguiente capítulo. La condición estándar es pH = 7.0, lo cual corresponde a 10^{-7} M $H^{\oplus}$ (en lugar de 1.0 M de otros reactivos y productos). El cambio en la energía libre de Gibbs en estas condiciones estándar está indicado mediante el símbolo $\Delta G^{\circ\prime}$.

La energía libre de Gibbs real de la sustancia A está relacionada con su energía libre estándar por

$$\Delta G_A = \Delta G_A^{\circ\prime} + RT \ln[A] \qquad \textbf{(1.11)}$$

donde R es la constante de gas universal (8.315 JK^{-1} mol^{-1}) y T es la temperatura en Kelvin. La energía libre de Gibbs está expresada en unidades de kJ mol^{-1}. (Una unidad más antigua es kcal mol^{-1}, la cual es igual a 4.184 kJ mol^{-1}). El término RT ln[A] es dado algunas veces como 2.303 RT log [A].

C. Constantes de equilibrio y cambios en la energía libre estándar de Gibbs

Para una reacción determinada, como la reacción 1.3, el cambio real en la energía libre de Gibbs está relacionado con el cambio en la energía libre estándar por

$$\Delta G_{\text{reacción}} = \Delta G^{\circ\prime}_{\text{reacción}} + RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]} \qquad \textbf{(1.12)}$$

Si la reacción alcanza el equilibrio, la relación de concentraciones en el último término de la ecuación 1.12 es, por definición, la constante de equilibrio (K_{eq}). Cuando la reacción está en equilibrio no existe cambio neto en las concentraciones de reactivos y productos, así que el cambio real en energía libre de Gibbs es cero ($\Delta G_{\text{reacción}} = 0$). Esto permite escribir una ecuación en la que se relaciona el cambio *estándar* en la energía libre de Gibbs y la constante de equilibrio. Así, en el equilibrio,

$$\Delta G^{\circ\prime}_{\text{reacción}} = -RT \ln K_{eq} = -2.303\ RT \log K_{eq} \qquad \textbf{(1.13)}$$

Esta importante ecuación relaciona a la termodinámica con el equilibrio de la reacción. Obsérvese que es la constante de equilibrio la que está relacionada con el cambio en la energía libre de Gibbs y no las constantes de velocidad individual descritas en las ecuaciones 1.6 y 1.7. Es la *relación* de esas constantes de velocidad individuales lo que importa y no sus valores absolutos. Las velocidades directa e inversa pueden ser muy lentas o muy rápidas y seguir generando la misma relación.

Las consideraciones termodinámicas informan si una reacción está favorecida, pero no qué tan rápido ocurrirá. Por ejemplo, se sabe que el hierro se oxida y que el cobre se colorea de verde, pero estas reacciones pueden llevar sólo unos pocos segundos o muchos años. La velocidad de una reacción depende de otros factores como la energía de activación (capítulo 6). La mayoría de las reacciones que se llevan a cabo en el interior de una célula son muy lentas en el tubo de ensayo incluso aunque estén favorecidas termodinámicamente. En el interior de una célula las velocidades de las reacciones normalmente lentas se aceleran gracias a la acción de las enzimas. Las velocidades de las reacciones catalizadas por enzimas pueden ser 10^{20} mayores que las velocidades de las reacciones correspondientes sin ayuda catalítica. Se invertirá más tiempo para explicar cómo funcionan las enzimas; es uno de los temas más fascinantes de la bioquímica.

1.5 Bioquímica y evolución

Un famoso genetista, Theodosius Dobzhansky, alguna vez dijo: "Nada en biología tiene sentido salvo a la luz de la evolución". Esto también se aplica a la bioquímica. Los bioquímicos y los biólogos moleculares han realizado contribuciones muy importantes para la comprensión de la evolución molecular. La evidencia que han descubierto confirma y extiende los datos extraídos de la anatomía comparativa, la genética poblacional y la paleontología. Se lleva recorrido un largo trayecto desde la evidencia original de la evolución que Carlos Darwin resumió por primera vez a mediados del siglo XIX.

Ahora se cuenta con una descripción muy confiable de la historia de la vida y de las relaciones de muchas especies diversas en existencia. Los primeros organismos fueron organismos unicelulares que probablemente ahora se clasificarían como procariotas. Los procariotas, o bacterias, carecen de la membrana que rodea al núcleo. Se han encontrado fósiles de organismos parecidos a bacterias primitivas en formaciones geológicas que tienen una antigüedad de al menos 3 mil millones de años. Las especies modernas de bacterias pertenecen a grupos tan diversos como las cianobacterias, las cuales

▲ Carlos Darwin (1809-1882).

son capaces de realizar la fotosíntesis, y las arqueobacterias, habitantes de entornos hostiles como las fuentes de agua termal.

Los eucariota tienen células que poseen una arquitectura interna compleja, como un núcleo prominente. En general, las células eucarióticas son más complejas y mucho más grandes que las células procarióticas. Una célula tisular eucariótica típica presenta un diámetro de aproximadamente 25 μm (25 000 nm), en comparación con las células procarióticas que por lo general son 1/10 de ese tamaño. Sin embargo, la evolución ha producido una diversidad tremenda, y son comunes desviaciones extremas a partir de los tamaños típicos. Por ejemplo, algunos organismos unicelulares eucarióticos son lo suficientemente grandes para ser visibles al ojo humano, y algunas células nerviosas en las médulas espinales de los vertebrados pueden medir varios centímetros de longitud, aunque sean de dimensiones microscópicas en cortes transversales. También existen megabacterias que son más grandes que la mayoría de las células eucarióticas.

En apariencia, todas las células de la Tierra (procarióticas y eucarióticas) evolucionaron a partir de un ancestro común que existió hace más de 3 mil millones de años. La evidencia de este ancestro común incluye la presencia en todos los organismos vivos de elementos bioquímicos constitutivos comunes, los mismos patrones generales del metabolismo y un código genético (con variaciones raras y leves). Se observarán muchos ejemplos de esta evidencia a través de este libro. El plan básico de las células primitivas ha sido ampliado con base en esta inventiva espectacular a través de miles de millones de años de evolución.

La importancia de la evolución para un completo entendimiento de la bioquímica no se puede subestimar. Se han de encontrar muchas rutas y procesos que sólo cobran sentido cuando se tiene en cuenta que han evolucionado a partir de precursores más primitivos. En el contexto molecular, la evidencia de esta evolución está preservada en las secuencias de genes y proteínas que se habrán de estudiar a medida que se aprende bioquímica. Con el fin de comprender por completo los principios fundamentales de la bioquímica se requiere examinar las rutas y procesos en diferentes especies, incluidas las bacterias y organismos modelos eucarióticos, así como una variedad de organismos de modelos eucarióticos como la levadura, las moscas de fruta, las plantas de floración, los ratones y los humanos. La importancia de la bioquímica comparada ha sido reconocida durante más de 100 años, pero su valor se ha incrementado en gran medida en la última década con la publicación de secuencias genómicas completas. Ahora existen condiciones para comparar rutas bioquímicas completas de diversas especies.

1.6 La célula es la unidad básica de la vida

Todos los organismos son unicelulares o están compuestos por muchas células. Las células existen en una variedad extraordinaria de tamaños y formas, pero todas se pueden clasificar como eucarióticas o procarióticas. Una sola célula simple puede ser representada como una gota de agua rodeada por una membrana plasmática. La gota de agua contiene materia disuelta y suspendida, como proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos. El alto contenido lipídico de las membranas las hace flexibles y de cierre automático. Debido a que las membranas representan barreras impermeables contra moléculas grandes y especies cargadas, permiten que las concentraciones biomoleculares dentro de las células sean mucho más altas que en el medio circundante. Todo el material encerrado por la membrana plasmática de una célula, con excepción del núcleo, se denomina citoplasma. El citoplasma puede contener grandes estructuras moleculares y organelos subcelulares circundados por membranas. Se denomina citosol a la porción acuosa del citoplasma, que excluye las estructuras subcelulares.

Los virus son partículas subcelulares infecciosas. Están compuestos por una molécula de ácido nucleico rodeada por una capa proteínica. El ácido nucleico vírico puede contener sólo tres genes o tantos como varios cientos. A pesar de su importancia biológica, los virus no son células verdaderas debido a que no pueden desempeñar reacciones metabólicas independientes. Se propagan al apoderarse de la maquinaria reproductiva de una célula anfitriona y desviarla para la formación de nuevos virus. En cierto sentido, los virus son parásitos genéticos.

Existen miles de virus diferentes. Aquellos que infectan a las células procarióticas por lo general se denominan bacteriófagos, o fagos. Gran parte de lo que se sabe acerca de la bioquímica se deriva del estudio de los virus y de los bacteriófagos y de su interac-

ción con las células que infectan. Por ejemplo, los intrones se descubrieron por primera vez en un adenovirus humano como el que se muestra en la página 1 de este capítulo, y el mapa detallado de los genes se realizó por primera vez con bacteriófagos T4.

En las siguientes dos secciones se habrán de explorar las características estructurales de las células procarióticas y eucarióticas típicas.

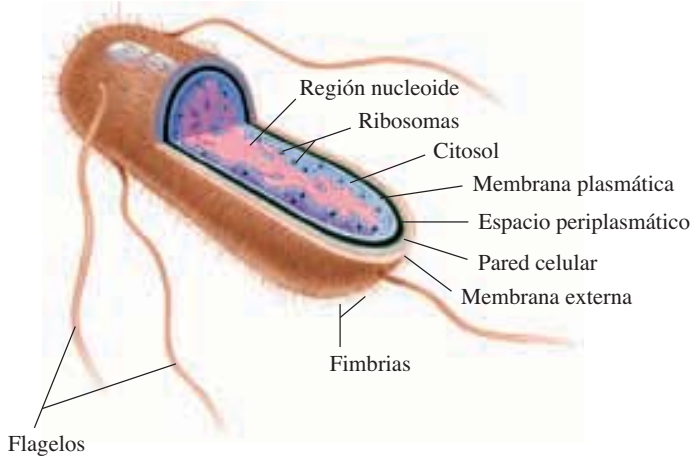
1.7 Células procarióticas: características estructurales

Por lo general los procariotas son organismos unicelulares. De todos los organismos vivos el que mejor se ha estudiado es la bacteria *Escherichia coli* (figura 1.14). Este organismo ha servido durante medio siglo como un modelo de sistema biológico y muchas de las reacciones bioquímicas que se describen más adelante en este libro fueron descubiertas por primera vez en la *E. coli.* A pesar de que la *E. coli* es una especie de bacteria muy típica, algunas bacterias son tan diferentes de la misma como los humanos lo son de las flores y los insectos. Gran parte de esta diversidad es aparente sólo a escala molecular.

Los procariotas se han encontrado en casi todos los ambientes concebibles en la Tierra, desde fuentes de agua térmica sulfurosa, por debajo del lecho oceánico y hasta en el interior de células más grandes. Representan una cantidad importante de la biomasa de la Tierra. A pesar de sus diferencias, los procariotas comparten varias características. Carecen de núcleo —su ADN está compactado en una región citoplasmática denominada región nucleoide. Muchas especies bacterianas cuentan sólo con 1000 genes. Desde una perspectiva bioquímica, una de las cuestiones más fascinantes acerca de las bacterias es que, a pesar de que sus cromosomas contienen un número relativamente pequeño de genes, desempeñan la mayor parte de las reacciones bioquímicas fundamentales que se encuentran en cualquier célula, incluidas las humanas. Docenas de genomas bacterianos se han secuenciado por completo y ahora es posible comenzar a definir el número mínimo de enzimas relacionadas con la vida.

La mayor parte de las bacterias carece de compartimientos internos definidos por membranas. Por lo general, la membrana plasmática está rodeada por una pared celular estructurada a base de una rígida red de cadenas peptídicas y carbohidratos enlazados de modo covalente. La pared celular confiere su forma característica a una especie individual de bacteria. A pesar de su resistencia, la pared celular es porosa. Además de esta pared celular, casi todas las bacterias, entre ellas la *E. coli*, poseen una membrana exterior compuesta por lípidos, proteínas y lípidos unidos a polisacáridos. El espacio entre la membrana plasmática interna y la membrana exterior se denomina espacio periplasmático. Se trata del mayor compartimiento circundado por membrana en las bacterias y desempeña una función central en algunos procesos bioquímicos importantes.

Muchas bacterias poseen fibras de proteína llamadas fimbrias en su superficie externa; sirven como sitios de unión para las interacciones intercelulares. La mayoría de las bacterias también dispone de uno o más flagelos, que son estructuras largas y con apariencia de látigo que pueden girar como aspas de motor de un barco, y por lo tanto conducir a la bacteria a través de su ambiente acuoso.



◀ Figura 1.14
Escherichia coli. Una célula de *E. coli* es de aproximadamente 0.5 μm de diámetro y 1.5 μm de longitud. Las fibras de proteína que se denominan flagelos giran para impulsar a la célula. Las fimbrias, más cortas, ayudan en la conjugación sexual y pueden contribuir a que *E. coli* se adhiera a las superficies. El espacio periplasmático es un compartimiento acuoso que separa la membrana plasmática y la membrana exterior.

La pequeña dimensión de los procariotas proporciona una alta relación entre el área superficial con respecto al volumen. Por lo tanto, la difusión simple es un medio adecuado para distribuir nutrientes a través del citoplasma. Una de las estructuras macromoleculares prominentes en el citoplasma es el ribosoma —un gran complejo de proteína— ARN que se requiere para la síntesis de proteínas. Todas las células vivientes tienen ribosomas, pero más adelante habrá ocasión de estudiar que los ribosomas bacterianos difieren de los ribosomas eucarióticos en detalles importantes.

1.8 Células eucarióticas: características estructurales

Los eucariotas incluyen plantas, animales, hongos y protistas. Los protistas son en su mayoría organismos pequeños y unicelulares que no encajan en alguna de las demás clases. Junto con las bacterias, estos cuatro grupos componen los cinco reinos de la vida de acuerdo con un esquema de clasificación popular. Otros esquemas conservan los cuatro reinos eucarióticos pero dividen a las bacterias en eubacterias y arqueobacterias.

Las células eucarióticas están rodeadas por una membrana plasmática única, a diferencia de las bacterias que por lo general disponen de una membrana doble. La más obvia de las características que distinguen a los eucariotas de los procariotas es el núcleo circundado por membrana en los eucariotas donde se localizan los cromosomas. Por lo general las células eucarióticas son más grandes que las células bacterianas, de manera habitual unas 1000 veces mayores en volumen. En consecuencia, se requieren estructuras internas y mecanismos complejos para la rápida transportación y comunicación tanto al interior de la célula como hacia y desde el medio externo. Una malla de fibras proteínicas denominada citoesqueleto se extiende a través de toda la célula y contribuye a la formación celular y a la administración del tráfico intracelular.

Casi todas las células eucarióticas contienen compartimientos internos circunscritos por membranas llamados organelos. Las funciones específicas de los organelos se vinculan en forma estrecha con las propiedades y estructuras físicas. No obstante, una cantidad importante de procesos bioquímicos específicos ocurren en el citosol. De hecho, más adelante se estudiará en este capítulo que el citosol, al igual que los organelos, probablemente esté altamente organizado.

La figura 1.15 muestra las células vegetal y animal típicas. Ambos tipos tienen un núcleo, mitocondrias y un citoesqueleto. Las células vegetales también contienen cloroplastos, vacuolas y muchas veces están rodeadas por una pared celular rígida. Los cloroplastos también se encuentran en algas y algunos protistas, y representan los sitios de la fotosíntesis. Las paredes celulares vegetales están compuestas por celulosa, uno de los polisacáridos descritos en la sección 1.3B.

El interior de una célula eucariótica está subdividido por una red de membrana intracelular. El área superficial de las membranas interiores puede constituir varias veces el área de la membrana plasmática. Los organelos independientes, entre ellos el núcleo, mitocondria y cloroplastos, existen en medio de un sistema de membrana unificado en constante cambio que se difunde a través de la célula entera. Los materiales fluyen dentro de las rutas definidas por las paredes de membrana y los túbulos. El tráfico intracelular de materiales entre los compartimientos es rápido, muy selectivo y regulado de forma rigurosa.

En la mayoría de los eucariotas multicelulares, los grupos de células con especialización similar están organizados en tejidos. Dentro de los tejidos, las células están conectadas o incrustadas en una matriz extracelular que contiene proteínas y polisacáridos. La matriz provee soporte físico al tejido y en algunos casos dirige el crecimiento y movimiento celular.

A. Núcleo

Por lo general el núcleo es la estructura más evidente en una célula eucariótica. La estructura que lo define es una envoltura nuclear, una membrana con dos capas que se unen en los poros nucleares recubiertos de proteínas. La envoltura nuclear se continúa con el retículo endoplásmico (véase más adelante). El núcleo es el centro de control de la célula y contiene 95% de su ADN, el cual se halla estrechamente comprimido con proteínas cargadas positivamente llamadas histonas y enrolladas en una masa densa llamada cromatina. La replicación del ADN y la trascripción del ADN en ARN ocurren en el interior del núcleo. Muchos eucariotas presentan una masa densa en el núcleo llamada nucleolo. El nucleolo es el sitio principal de la síntesis de ARN y el sitio del ensamblado de los ribosomas a partir de sus subunidades.

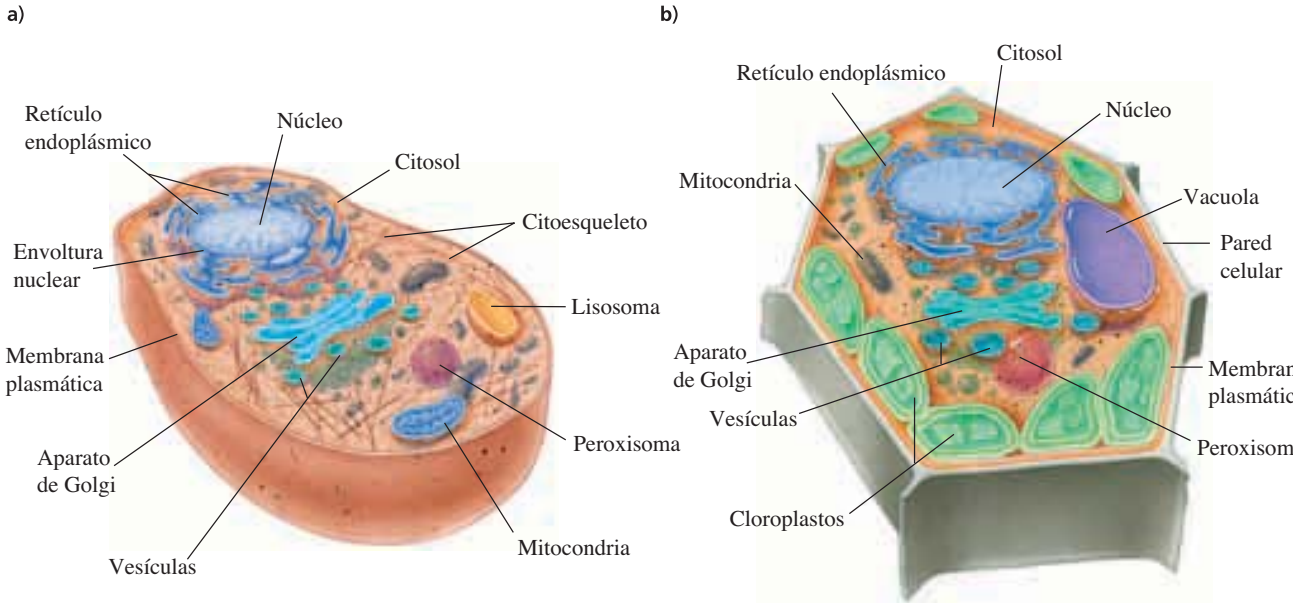
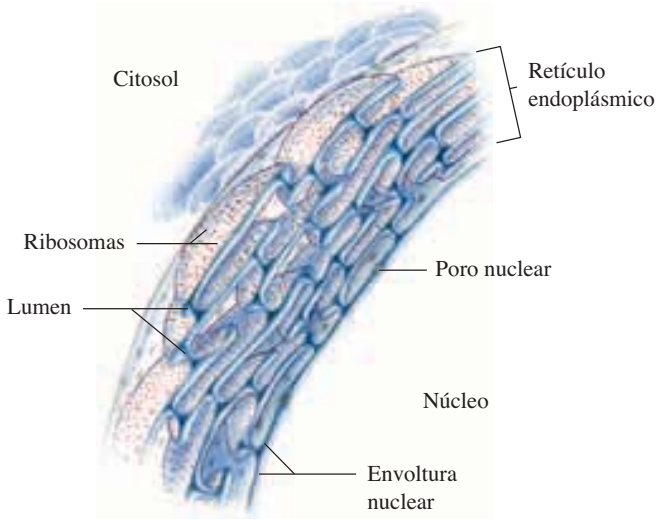


Figura 1.15 ▲
Células eucarióticas. **a)** Célula animal. Las células animales suelen ser células eucarióticas que contienen organelos y estructuras que también se encuentran en los protistas, hongos y plantas. **b)** Célula vegetal. La mayoría de las células vegetales contiene cloroplastos, los sitios de la fotosíntesis en plantas y algas; vacuolas, organelos grandes y llenos de líquido que contienen solutos y desechos celulares, así como paredes celulares rígidas compuestas por celulosa.

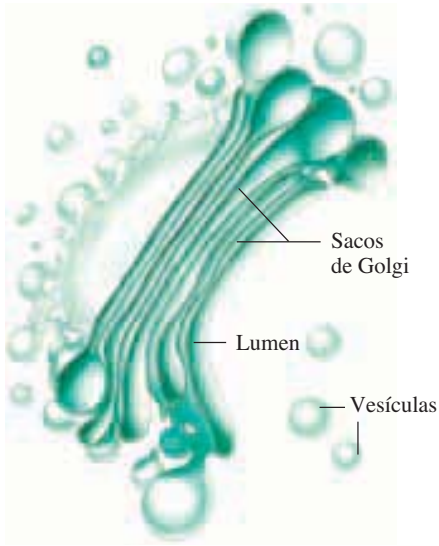
La mayoría de los eucariotas contiene mucho más ADN que los procariotas. Mientras que el material genético, o genoma, de los procariotas suele ser una molécula circular única de ADN, el genoma eucariótico está organizado como cromosomas lineales múltiples. En los eucariotas, el nuevo ADN y las histonas se sintetizan durante la preparación para la división celular, en la que el material cromosómico se condensa y separa en dos conjuntos idénticos de cromosomas. Este proceso se denomina mitosis. La célula entonces se divide en dos para la completa división celular.

B. El retículo endoplásmico y el aparato de Golgi

Una red de hojas de membrana y túbulos llamada retículo endoplásmico (RE) se extiende desde la membrana externa del núcleo. La región acuosa encerrada dentro del



◀ Envoltura nuclear y retículo endoplásmico de una célula eucariótica.



▲ Aparato de Golgi. Muchas veces asociado con el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi es responsable de la modificación y clasificación de algunas biomoléculas. Las proteínas insertas en el lumen del retículo endoplásmico se transportan al aparato de Golgi para su clasificación y secreción. Las vesículas transportan material modificado a destinos internos y externos a la célula.

retículo endoplásmico se denomina lumen. En muchas células, parte de la superficie del retículo endoplásmico está cubierta por ribosomas que se encuentran sintetizando activamente las proteínas. A medida que la síntesis continúa, la proteína es desplazada a través de la membrana hacia el lumen. En caso de las proteínas incrustadas a la membrana, parte de la proteína permanece inserta en la membrana después de ser liberada del ribosoma. Las proteínas destinadas a la exportación desde la célula, se expulsan completamente a través de la membrana del retículo endoplásmico hacia su lumen, donde son empacadas en vesículas membranosas. Estas vesículas se trasladan a través de las células, se funden con la membrana plasmática y liberan sus contenidos hacia el espacio extracelular. La síntesis de las proteínas destinadas a permanecer en el citosol ocurre en los ribosomas que no están unidos al retículo endoplásmico. Muchos sistemas enzimáticos implicados en el metabolismo de los lípidos están concentrados en regiones del retículo endoplásmico que no tienen ribosomas adheridos.

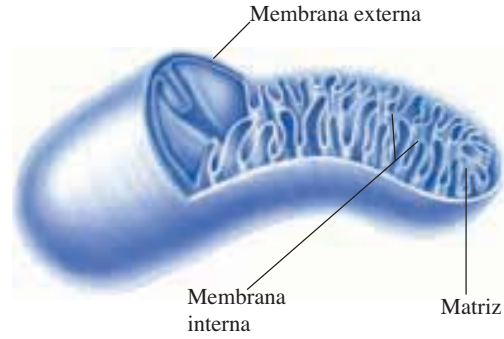
En muchas especies, un complejo de sacos membranosos aplanados y llenos de líquido denominado aparato de Golgi se encuentra con frecuencia próximo al retículo endoplásmico y al núcleo. Las vesículas provenientes del retículo endoplásmico se fusionan con el aparato de Golgi. Los contenidos de las vesículas pueden ser modificados químicamente a medida que atraviesan las capas del aparato de Golgi. Entonces, los productos modificados se clasifican, se empacan en nuevas vesículas y se transportan a diferentes destinos específicos al interior o exterior de la célula.

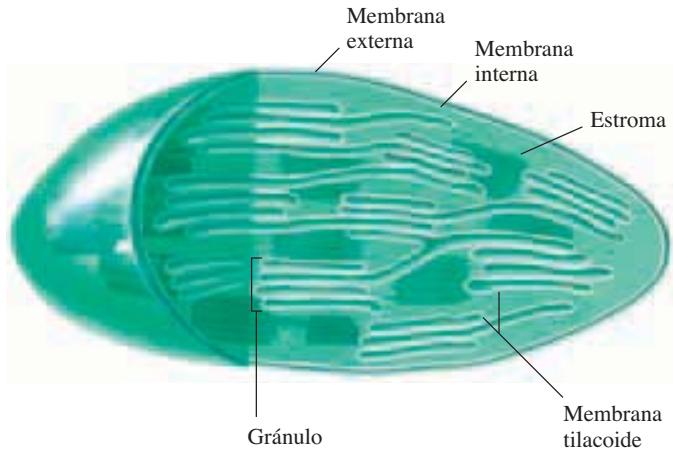
C. Mitocondrias y cloroplastos

Las mitocondrias y los cloroplastos tienen funciones centrales en la transducción de energía. Las mitocondrias son los sitios principales del metabolismo oxidativo de la energía. Se encuentran en casi todas las células eucarióticas. Los cloroplastos son los sitios en los que se realiza la fotosíntesis en plantas y algas.

La mitocondria tiene una membrana interna y otra externa. La membrana interna presenta múltiples pliegues que dan como resultado un área superficial de tres a cinco veces la de la membrana externa. Es impermeable a los iones y a la mayoría de los metabolitos. La fase acuosa encerrada por la membrana interna se denomina matriz mitocondrial. Muchas de las enzimas que participan en el metabolismo de la energía aeróbica se encuentran en la membrana interna y en la matriz. La función más importante de la mitocondria consiste en oxidar los ácidos orgánicos, ácidos grasos y aminoácidos para convertirlos en dióxido de carbono y agua. Gran parte de la energía liberada se conserva en forma de un gradiente de concentración protónica a través de la membrana interna mitocondrial. Esta energía almacenada se utiliza para alimentar la conversión del adenosin difosfato (ADP) y del fosfato inorgánico (P_i) en la molécula rica en energía ATP mediante un proceso de fosforilación que se describe con más detalle en el capítulo 14. Así, la célula utiliza el ATP para procesos que requieran energía como la biosíntesis, el transporte de ciertas moléculas y iones en contra de los gradientes de concentración y carga, y la generación de fuerza mecánica para propósitos como la locomoción y contracción muscular. La cantidad de mitocondrias encontradas en las células varía con amplitud. Algunas células eucarióticas sólo contienen unas pocas mitocondrias, mientras otras poseen miles.

▶ Mitocondria. Las mitocondrias son los sitios principales de la transducción de energía en las células eucarióticas. El metabolismo de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos se lleva a cabo en este organelo.





◀ Cloroplasto. Los cloroplastos son los sitios de la fotosíntesis en plantas y algas. Los pigmentos asociados con la membrana tilacoide capturan la energía de la luz y la utilizan para convertir el dióxido de carbono y agua en carbohidratos.

Las células vegetales fotosintéticas contienen cloroplastos así como mitocondrias. Además de una membrana externa doble, los cloroplastos contienen una tercera membrana interna altamente plegada que forma un sistema de sacos aplanados denominada membrana tilacoide. La membrana tilacoide, suspendida en el estroma acuoso, contiene clorofila y otros pigmentos que participan en la captura de energía luminosa. En muchas especies, la membrana tilacoide está organizada en pilas denominadas grana. Los ribosomas y varias moléculas de ADN circular se hallan también suspendidas en el estroma. En los cloroplastos, la energía capturada de la luz se utiliza para la formación de carbohidratos a partir del dióxido de carbono y agua.

Las mitocondrias y los cloroplastos derivan de las bacterias que formaron parte de las relaciones simbióticas internas con las células eucarióticas primitivas hace más de 1000 millones de años. La evidencia del origen endosimbiótico (*endo-*, dentro) de las mitocondrias y los cloroplastos incluye la presencia dentro de estos organelos de genomas pequeños y separados así como de ribosomas específicos que recuerdan a los de las bacterias. En años recientes, las secuencias del ADN y de las proteínas bacterianos se ha comparado con las del ADN y las proteínas en las mitocondrias y cloroplastos. Estos estudios en evolución molecular han demostrado que las mitocondrias derivan de miembros primitivos de un grupo particular de bacterias llamadas proteobacterias. Los cloroplastos descienden de una clase de bacterias fotosintéticas relativamente distantes llamadas cianobacterias.

D. Vesículas especializadas

Las células eucarióticas contienen vesículas digestivas especializadas llamadas lisosomas. Estas vesículas están circundadas por una sola membrana que encierra un interior muy ácido. La acidez es mantenida por bombas de protones incrustadas en la membrana. Los lisosomas contienen una variedad de enzimas que catalizan la descomposición de macromoléculas celulares como proteínas y ácidos nucleicos. También pueden digerir grandes partículas como las mitocondrias excluidas y bacterias ingeridas por la célula. Las enzimas lisosómicas son mucho menos activas al pH casi neutral del citosol en comparación con las que están bajo las condiciones ácidas del interior del lisosoma. Esta característica especial de las enzimas lisosómicas las preserva de catalizar de manera accidental la degradación de macromoléculas en el citosol.

Los peroxisomas están presentes en las células animales y en muchas células vegetales. Al igual que los lisosomas, están rodeados por una sola membrana. Los peroxisomas desempeñan reacciones de oxidación, algunas de las cuales producen el compuesto tóxico peróxido de hidrógeno, H_2O_2. Una parte del peróxido de hidrógeno se utiliza para la oxidación de otros compuestos. El exceso de H_2O_2 se destruye mediante la acción de la enzima peroxisómica catalasa, la cual cataliza la conversión de H_2O_2 en agua y O_2.

Las vacuolas son vesículas llenas de líquido rodeadas por una sola bicapa lipídica. Son comunes en células vegetales maduras y en algunos protistas. Estas vesículas son sitios de almacenamiento de agua, iones y nutrientes como la glucosa. Algunas vacuo-

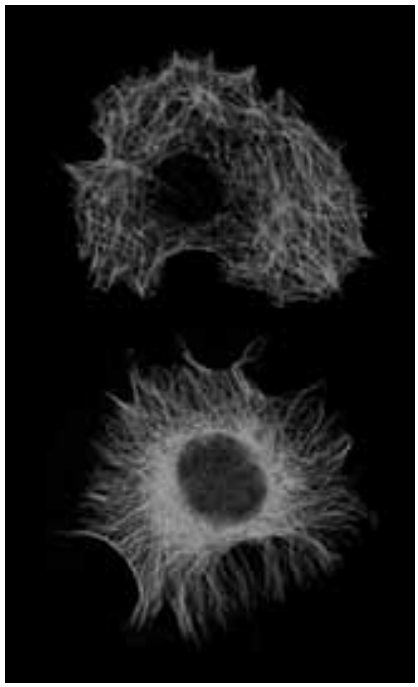


Figura 1.16▲
Micrografías de filamentos de actina y microtúbulos marcados con fluorescencia en células de mamíferos. **(Parte superior)** Filamentos de actina en células musculares de rata. **(Parte inferior)** Microtúbulos en células endoteliales humanas. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

las contienen productos de desperdicio metabólicos, y otras contienen enzimas que pueden catalizar la degradación de macromoléculas que la planta ya no necesitará.

E. El citoesqueleto

El citoesqueleto es una especie de andamio de proteínas requerido para el sostén, organización interna e incluso movimiento de la célula. Algunas clases de células animales contienen un citoesqueleto denso (figura 1.16), pero es mucho menos evidente en la mayoría de las demás células eucarióticas. El citoesqueleto está compuesto por tres tipos de filamentos de proteína: filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios. Los tres tipos están constituidos por moléculas individuales de proteína que se combinan para formar fibras parecidas a hilos delgados.

Los filamentos de actina (también llamados microfilamentos) son los componentes más abundantes del citoesqueleto. Están compuestos por una proteína llamada actina que forma hilos muy delgados parecidos a cuerdas con un diámetro de aproximadamente 7 nm. La actina se ha encontrado en toda las células eucarióticas y con frecuencia representa la proteína más abundante en la célula. También es una de las proteínas que más se ha conservado en el proceso evolutivo. Evidencia de ello es que todos los filamentos de actina están presentes en las células eucarióticas ancestrales a partir de las cuales descienden todos los eucariotas modernos.

Los microtúbulos son fibras fuertes y rígidas que suelen encontrarse comprimidos en haces. Tienen un diámetro de aproximadamente 22 nm, lo cual los hace mucho más gruesos que los filamentos de actina (figura 1.16). Los microtúbulos están compuestos por una proteína llamada tubulina, otra proteína altamente conservada (de hecho existen varios tipos diferentes de tubulina). Los microtúbulos sirven como un tipo de esqueleto interno en el citoplasma, pero también forman el huso mitótico durante la mitosis. Además, los microtúbulos pueden formar estructuras capaces de producir movimiento dirigido, como los cilios. Los flagelos de las células espermáticas son un ejemplo de cilios muy largos. El movimiento ondulante de cilios y flagelos es posible gracias a la energía proveniente del ATP.

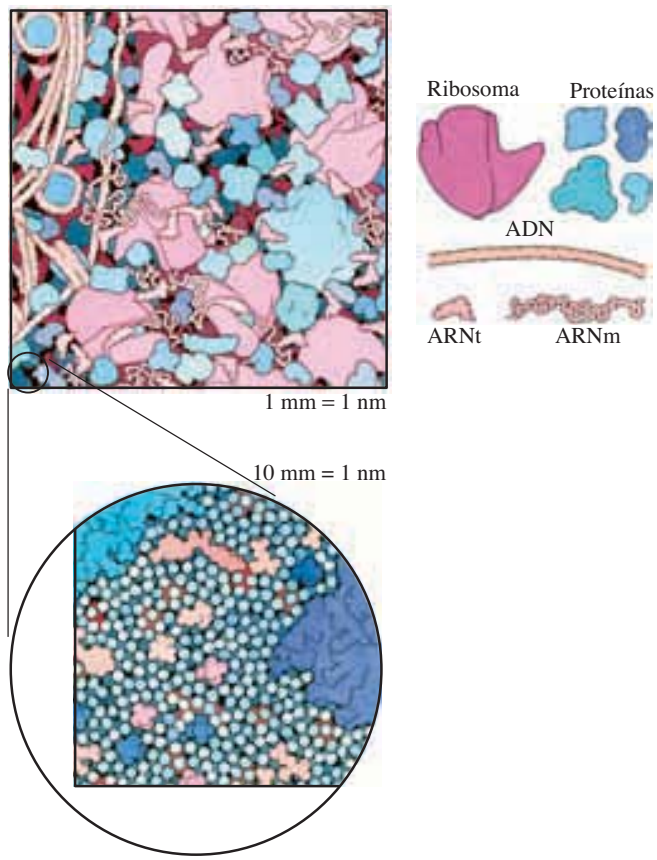
Los filamentos intermedios se encuentran en el citoplasma de la mayoría de las células eucarióticas. Estos filamentos tienen diámetros de aproximadamente 10 nm, lo cual los hace de tamaño intermedio en comparación con los filamentos de actina y los microtúbulos. Los filamentos recubren el interior de la envoltura nuclear y se extienden del núcleo hacia la periferia de la célula. También ayudan a que la célula resista las tensiones mecánicas externas.

1.9 Un retrato de la célula viviente

Se acaban de presentar las principales estructuras que se encuentran dentro de las células y también de describir sus funciones. Estas estructuras son de tamaño inmenso comparadas con las moléculas y los polímeros, que han de constituir el tema central en el resto del libro. Las células contienen miles de diferentes metabolitos y muchos millones de moléculas. En el citosol de cada célula existen cientos de diferentes enzimas y cada una actúa de manera específica sobre uno sólo o quizá en algunos pocos metabolitos. Tal vez haya 100 000 copias de algunas enzimas por célula, pero sólo algunas pocas copias de otras enzimas. Cada enzima es bombardeada con sustratos potenciales.

El biólogo molecular y artista David S. Goodsell ha producido imágenes cautivantes que muestran los contenidos moleculares de una célula de *E. coli* magnificada un millón de veces (figura 1.17). Aproximadamente 600 cubos de este tamaño representan el volumen de una célula de *E. coli*. A esta escala, los átomos individuales son de alrededor del tamaño del punto en la letra i, y los pequeños metabolitos son más pequeños que un grano de arroz; las proteínas son del tamaño de un pequeño caramelo.

Un dibujo de una molécula en una célula muestra qué tan comprimido puede estar el citoplasma, pero no puede dar una idea de su actividad a escala atómica. Las moléculas en la célula se encuentran en un movimiento incesante. Los choques entre ellas son completamente elásticos —la energía de una colisión se conserva en la energía del rebote. A medida que las moléculas rebotan entre sí, se trasladan en una ruta sinuosa y frenética en el espacio llamada caminata aleatoria de difusión. Para una pequeña molécula como el agua, la distancia media que transcurre entre los choques es menor que las dimensiones de la molécula, y la ruta presenta muchas inversiones de dirección. A pesar de su ru-



◀ Figura 1.17
Porción del citosol de una célula de *E. coli.* La parte superior de la ilustración, en la cual el contenido está aumentado un millón de veces, representa una ventana de 100 × 100 nm. Las proteínas se encuentran sombreadas en azul y verde. Los ácidos nucleicos están en rosa. Las estructuras grandes son los ribosomas. El agua y los pequeños metabolitos no se muestran. Los contenidos en el interior del círculo están aumentados 10 millones de veces y muestran agua y otras pequeñas moléculas. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

ta intrincada, una molécula de agua se puede difundir a lo largo de una célula de *E. coli* en 1/10 de segundo. Una enzima y una pequeña molécula chocarán un millón de veces por segundo. En estas condiciones, puede alcanzarse una velocidad de catálisis típica en muchas enzimas, incluso si sólo una en aproximadamente 1000 colisiones resulta en una reacción. A pesar de ello, algunas enzimas catalizan reacciones con una eficiencia mucho mayor que una reacción por 1000 colisiones. De hecho, pocas enzimas catalizan reacciones con casi cada molécula de sustrato con la que se encuentren sus sitios activos —un ejemplo de la potencia extraordinaria de la química dirigida por enzimas. El estudio de las velocidades de reacción enzimática, o la cinética enzimática, es uno de los aspectos fundamentales de la bioquímica que se cubrirá en el capítulo 6.

Los lípidos en las membranas también se difunden con gran fuerza, aunque sólo dentro del plano bidimensional de la bicapa lipídica. Las moléculas lipídicas intercambian lugares con las moléculas vecinas en las membranas alrededor de 6 millones de veces por segundo. Algunas proteínas de membrana también se difunden con rapidez dentro de la membrana.

Las moléculas grandes se difunden con más lentitud que las pequeñas. En las células eucarióticas, la difusión de moléculas grandes como las enzimas se retarda aún más por la red compleja del citoesqueleto. Las moléculas grandes se difunden a través de una distancia determinada hasta 10 veces más lentamente en el citosol que en agua pura.

La amplitud total de la organización citosólica aún no se conoce. Varias proteínas y enzimas forman grandes complejos que desempeñan una serie de reacciones. Se encontrarán varios de estos complejos cuando se estudie el metabolismo. Muchas veces se conocen como máquinas de proteínas. Esta distribución encierra la ventaja de que los metabolitos pasan directamente de una enzima a la siguiente sin difundirse en el citosol. Muchos investigadores simpatizan con la idea de que el citosol no es tan sólo una mezcla aleatoria de moléculas solubles sino que presenta una alta organización, en contraste con la impresión que por mucho tiempo se tuvo acerca de que la química de la disolución simple gobernaba la actividad citosólica. El concepto de un citosol altamente organizado

es una idea relativamente nueva en bioquímica y puede conducir a nuevos descubrimientos importantes acerca del funcionamiento de las células en el terreno molecular.

1.10 La bioquímica es multidisciplinaria

Una de las metas de los bioquímicos es integrar un gran cuerpo de conocimiento para conformar una explicación molecular de la vida. Esto ha sido, y continúa siendo, una tarea desafiante. Sin embargo, los bioquímicos han realizado grandes avances hacia la definición de las reacciones básicas comunes a todas las células y han entendido cómo están interrelacionadas estas reacciones.

La bioquímica como disciplina no existe en un vacío. Ya se vio cómo la física, la química, la biología celular y la evolución contribuyen a una comprensión de la bioquímica. Las disciplinas relacionadas, como la fisiología y la genética, también son importantes. De hecho, muchos científicos ya no se consideran a sí mismos simplemente biólogos sino que son reconocidos en varios campos relacionados.

Como todos los aspectos de la bioquímica están interrelacionados, es difícil presentar un tema sin referirse a los demás. Por ejemplo, la función está íntimamente ligada con la estructura, y la regulación de las actividades enzimáticas individuales, que se pueden apreciar sólo en el contexto de una serie de reacciones vinculadas. La interrelación de los temas bioquímicos es un problema tanto para los estudiantes como para los maestros en un curso de introducción a la bioquímica. El material se debe presentar de una forma lógica y secuencial. No hay una secuencia universal de los temas que se adecue a todos los cursos, o a cada libro de texto. Por fortuna, existe un acuerdo general para la creación de un diseño amplio que ayude a entender los principios básicos de la bioquímica y este libro de texto sigue ese diseño. Se comenzará con dos capítulos de introducción. Después se pasará a describir las estructuras y funciones de las proteínas y enzimas, carbohidratos y lípidos. La tercera parte del libro hace uso de la información estructural para describir el metabolismo y su regulación. Por último, se examinarán los ácidos nucleicos y el almacenamiento y transmisión de la información biológica.

Algunos cursos pueden cubrir el material en un orden ligeramente diferente. Por ejemplo, las estructuras de los ácidos nucleicos se pueden describir antes de la sección del metabolismo. Siempre que ha sido posible, se ha intentado escribir los capítulos de manera que se puedan cubrir en diferentes órdenes dentro de un curso según las necesidades e intereses particulares de los estudiantes.

Apéndice *La terminología especial de la bioquímica*

La mayoría de las cantidades bioquímicas se especifican mediante las unidades del sistema internacional (SI). Algunas unidades comunes se enlistan en la tabla 1.1. Muchos bioquímicos siguen utilizando las unidades más tradicionales, aunque éstas desaparezcan con rapidez de la literatura científica. Por ejemplo, los químicos de proteínas algunas veces utilizan el angstrom (Å) para indicar distancias interatómicas; 1 Å es igual a 0.1 nm, la unidad preferida del SI. Las calorías (cal) se utilizan algunas veces en lugar de los joules (J); 1 cal es igual a 4.184 J.

La unidad estándar del SI de temperatura es el grado kelvin, pero la temperatura se indica con más frecuencia en grados Celsius (°C). Un grado Celsius es igual en magnitud a uno kelvin, pero la escala Celsius comienza en el punto de congelación del agua (0°C) y 100 °C es el punto de ebullición del agua a 1 atm. Esa escala muchas veces se denomina como escala centígrada (centi = 1/100). El cero absoluto es −273° C, que es igual a 0^{o} K. En mamíferos de sangre caliente las reacciones bioquímicas ocurren a la temperatura corporal (37°C en humanos).

Los valores numéricos muy grandes o muy pequeños para algunas unidades se pueden indicar mediante un prefijo apropiado. Los prefijos utilizados más comúnmente y sus símbolos se enumeran en la tabla 1.2. Además de las unidades estándar empleadas en todos los campos, la bioquímica tiene su propia terminología especial; por ejemplo, los bioquímicos utilizan abreviaturas convenientes para los compuestos bioquímicos con nombres largos.

Los bioquímicos utilizan numerosas abreviaturas con el fin de evitar repetir los nombres químicos largos. Los términos ARN y ADN son buenos ejemplos de esto. Son versiones acortadas de nombres largos para el ácido ribonucleico y ácido desoxirribonucleico. Las abreviaturas como éstas son muy convenientes, y aprender a asociarlas con sus correspondientes estructuras químicas es un paso necesario para dominar la bioquímica. En este libro se describirán las abreviaturas comunes en cada nueva clase de compuestos que se presente.

TABLA 1.1 Unidades del SI que se utilizan comúnmente en la bioquímica

Cantidad física	Unidad SI	Símbolo
Longitud	metro	m
Masa	gramo	g
Cantidad	mol	mol
Volumen	litro[a]	L
Energía	joule	J
Potencial eléctrico	voltio	V
Tiempo	segundo	s
Temperatura	kelvin[b]	K

[a] 1 litro = 1 centímetro cúbico
[b] 273° K = 0°C.

TABLA 1.2 Términos comúnmente utilizados con unidades del SI

Prefijo	Símbolo	Factor de multiplicación
giga-	G	10^{9}
mega-	M	10^{6}
kilo-	k	10^{3}
deci -	d	10^{-1}
centi-	c	10^{-2}
mili-	m	10^{-3}
micro-	μ	10^{-6}
nano-	n	10^{-9}
pico-	p	10^{-12}
femto-	f	10^{-15}

Lecturas seleccionadas

Química

Bruice, P. Y. (2004). *Organic Chemistry,* 4ta ed. (Upper Saddle River, Nueva Jersey: Prentice Hall). Uno de muchos libros de texto excelentes sobre química orgánica, que cubre los principios básicos de las reacciones químicas.

Tinoco, I., Sauer, K., Wang, J.C., y Puglisi, J. D. (2002). *Physical Chemistry: Principles and Applications in Biological Sciences* 4ta ed. (Upper Saddle River, Nueva Jersey: Prentice Hall). Una clásica fuente de referencia para obtener información de temas sobre termodinámica, velocidades de reacción y equilibrio químico.

van Holde, K. E., Johnson. W. C., y Ho, P.S. *(1998). Principles of Physical Biochemistry* (Upper Saddle River, Nueva Jersey: Prentice Hall). Este libro presenta una descripción más detallada de la termodinámica para estudiantes que deseen explorar este tema.

Células

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Waller, J. (2002). *Molecular Biology of the Cell,* 4ta ed. (Nueva York: Garland). Una visión general excelente de la estructura y función celulares.

Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A, Kreiger, M., Scott, M.P., Zipursky, L., y Darnell, J. (2003). *Molecular Cell Biology.* 5ta ed. (Nueva York. USA: Scientific American Books). Un magistral libro de texto de introducción.

Goodsell. D. S. (1993). *The Machinery of Life* (Nueva York: Springer-Verlag). Una perspectiva celular desde el nivel molecular.

Neidhardt, F. C. Ingraham, J. L., y Schaechter, M. (1990). *Physiology of the Bacterial Cell: A Molecular Approach* (Sunderland, MA. USA: Sinauer). Referencia estándar.

Evolución y diversidad de la vida

Margulis, L., y Schwartz, K.V. (1998). *Five Kingdoms,* 3ra ed. (Nueva York, USA: W.H. Freeman). El mejor resumen de reinos y razas.

Graur. D., y Li, W.-H. (2000). *Fundamentals of Molecular Evolution* (Sunderland, MA, USA: Sinauer). Excelente libro de referencia para aquellos que prefieran ahondar en este tema.

2

capítulo dos

El agua

La vida en la Tierra se suele describir como un fenómeno basado en el carbono, pero sería igualmente correcto llamarlo un fenómeno basado en el agua. Es probable que la vida se haya originado en el agua, hace más de tres mil millones de años, y que todas las células vivientes sigan dependiendo del agua para existir. En la mayor parte de las células el agua es la molécula más importante y forma de 60 a 90% de su masa , aunque hay pocas excepciones, como las semillas y las esporas, de las cuales se expulsa el agua. Las semillas y las esporas pueden permanecer latentes por largos periodos hasta "revivir" por la reintroducción de agua.

En el estudio de la bioquímica es importante comprender al agua y sus propiedades. Los componentes macromoleculares de las células —proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos y membranas— asumen sus formas características como respuesta al agua. Algunos tipos de moléculas interaccionan en forma extensa con el agua y en consecuencia son muy solubles. Otras moléculas no se disuelven con facilidad en el agua y tienden a asociarse entre sí para evitar el agua. Gran parte de la maquinaria metabólica de las células debe operar en un ambiente acuoso porque el agua es un solvente esencial y también un sustrato de numerosas reacciones celulares.

Este estudio detallado de la química de la vida comenzará examinando las propiedades del agua. Sus propiedades físicas le permiten funcionar como solvente de sustancias iónicas y polares, mientras que sus propiedades químicas condicionan que forme enlaces débiles con otros compuestos, incluso otras moléculas de agua. Las propiedades químicas del agua se relacionan también con las funciones de las macromoléculas, de las células y de los organismos completos. Dichas interacciones son importantes en la estabilidad estructural de las macromoléculas y de las celulas. Se apreciará cómo afecta el agua las interacciones de las sustancias que tienen poca solubilidad en ésta. Se examinará la ionización del agua y se describirá la química de ácidos y bases, temas básicos para comprender las moléculas y los procesos metabólicos que integran los capítulos siguientes.

Arriba: La Tierra desde el espacio. La Tierra es un planeta acuático, y el agua juega un papel central en la química de la vida.

2.1 La molécula de agua es polar

La molécula de agua (H_2O) tiene forma de V (figura 2.1a) y el ángulo entre los dos enlaces covalentes O—H es de 104.5°. Algunas propiedades importantes del agua se deben a la forma angulada y a los enlaces intermoleculares que puede formar. Un átomo de oxígeno tiene ocho electrones y su núcleo cuenta con ocho protones y ocho neutrones. Hay dos electrones en la capa interna y seis en la capa externa de este átomo. La capa externa presenta el potencial de contener cuatro pares de electrones en un orbital *s* y tres orbitales *p*. Sin embargo, la estructura y las propiedades del agua se pueden explicar mejor si se supone que los electrones de la capa externa ocupan cuatro orbitales híbridos sp^3. Imagínese el lector que esos cuatro orbitales ocupan las cuatro esquinas de un tetraedro que rodea al átomo central de oxígeno. Dos de los orbitales híbridos sp^3 de un átomo de oxígeno contienen electrones aislados, lo cual significa que el oxígeno puede formar enlaces covalentes con otros átomos, compartiendo electrones para llenar dichos orbitales. En el agua, los enlaces covalentes implican a dos átomos distintos de hidrógeno, cada uno de los cuales comparte su único electrón con el átomo de oxígeno. En la figura 2.1b cada par de electrones se representa con dos puntos negros, y se aprecia que cada orbital híbrido sp^3 del átomo de oxígeno está ocupado por dos electrones, incluidos los que comparte con los átomos de hidrógeno. La capa interna del átomo de hidrógeno también se llena con esos electrones compartidos en el enlace covalente.

El ángulo del enlace H—O—H en el agua es de 104.5°, pero si los orbitales electrónicos apuntaran en realidad a las cuatro esquinas de un tetraedro el ángulo sería de 109.5°. La explicación normal de esta diferencia es que existe una fuerte repulsión entre pares de electrones solitarios y esa repulsión trata de unir los enlaces covalentes, con reducción del ángulo de 109.5° a 104.5°.

Un núcleo de oxígeno atrae a los electrones más que el protón único del núcleo del hidrógeno; en otras palabras, los átomos de oxígeno son más electronegativos que los de hidrógeno. El resultado es que se suscita una distribución desigual de cargas dentro de cada enlace O—H en la molécula de agua, con el oxígeno teniendo una carga negativa parcial ($\delta^{\ominus}$) y el hidrógeno con una carga positiva parcial ($\delta^{\oplus}$). Esta distribución desigual de la carga dentro del enlace se llama dipolo y se dice que el enlace es polar.

La polaridad de una molécula depende tanto de la polaridad de sus enlaces covalentes como de su geometría. La disposición angulada de los enlaces polares O—H del agua produce un dipolo permanente para toda la molécula, como muestra la figura 2.2a. Una molécula de amoniaco también contiene un dipolo permanente (figura 2.2b). Así, aun cuando el agua y el amoniaco gaseoso son eléctricamente neutros, ambas moléculas son polares. La gran solubilidad de las moléculas polares de amoniaco en el agua se ve facilitada por fuertes interacciones con las moléculas polares del agua. La solubilidad del amoniaco en el agua demuestra el principio de que "lo semejante disuelve a lo semejante". No todas las moléculas son polares; por ejemplo, el dióxido de carbono también contiene enlaces covalentes polares pero están alineados entre ellos y con orientación opuesta, por lo que las polaridades se anulan entre sí (figura 2.2c). El resultado es que el dióxido de carbono carece de dipolo neto y es mucho menos soluble en agua que el amoniaco.

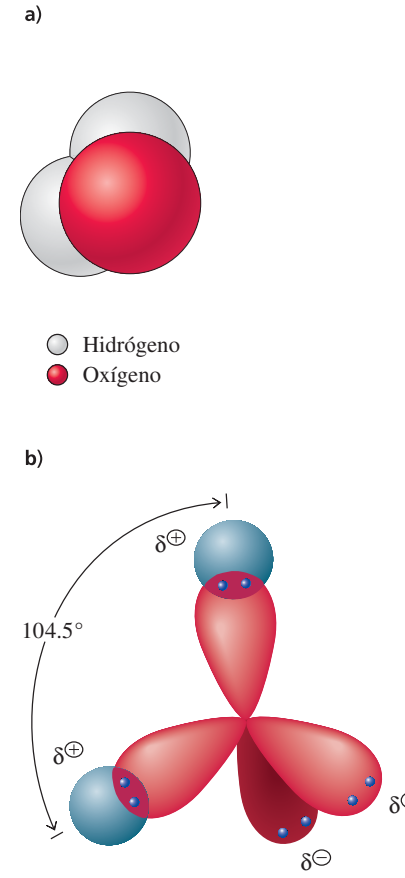
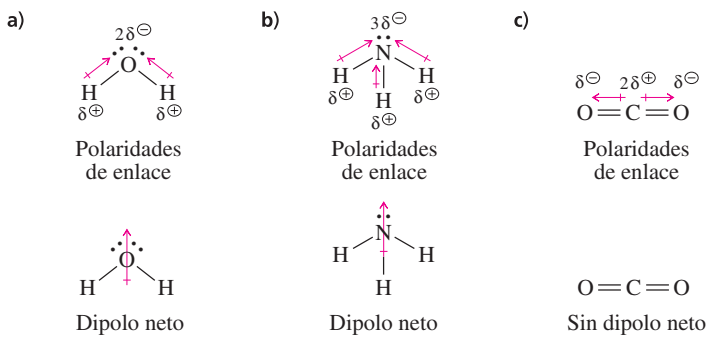


Figura 2.1 ▲
a) Estructura espacial de una molécula de agua. **b)** Ángulo entre los enlaces covalentes de una molécula de agua. Dos de los orbitales híbridos sp^3 del átomo de oxígeno participan en los enlaces covalentes con los orbitales *s* de los átomos de hidrógeno. Los otros dos orbitales sp^3 están ocupados por pares solitarios de electrones.

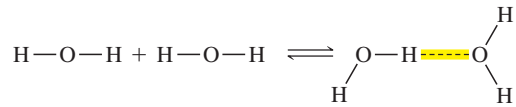


◀ Figura 2.2
Polaridad de moléculas pequeñas. **a)** La geometría de los enlaces covalentes en el agua produce un dipolo permanente de ella y el oxígeno que tiene una carga negativa parcial (representada por $2\delta^{\ominus}$) y cada hidrógeno que tiene una carga positiva parcial (representada por $\delta^{\oplus}$. **b)** La forma piramidal de una molécula de amoniaco también produce un dipolo permanente. **c)** Las polaridades de los enlaces colineales en el dióxido de carbono se anulan entre sí. Por consiguiente, el CO_2 no es polar. (Las flechas que representan dipolos apuntan hacia la carga negativa y tienen una cruz en el extremo positivo).

2.2 Puentes de hidrógeno en el agua

Una de las consecuencias importantes de la polaridad de la molécula de agua es que dichas moléculas se atraen entre sí. La atracción entre uno de los átomos de hidrógeno, ligeramente positivo, de una molécula de agua y los pares de electrones parcialmente negativos en uno de los orbitales híbridos sp^3, produce un "puente de hidrógeno" (figura 2.3). En un **puente de hidrógeno** entre dos moléculas de agua, el átomo de hidrógeno permanece enlazado covalentemente a su átomo de oxígeno que es el donador de hidrógeno. Al mismo tiempo, está unido a otro átomo de oxígeno, llamado aceptor de hidrógeno. De hecho, el átomo de hidrógeno está compartido (en forma desigual) entre los dos átomos de oxígeno. La distancia del átomo de hidrógeno al átomo de oxígeno aceptor tiene más o menos una longitud del doble que la del enlace covalente.

El agua no es la única molécula capaz de formar puentes de hidrógeno; esas interacciones pueden existir entre cualquier átomo electronegativo y un átomo de hidrógeno unido a otro átomo electronegativo. (Se examinan otros ejemplos de puentes de hidrógeno en la sección 2.5B). Los puentes de hidrógeno son mucho más débiles que los enlaces covalentes típicos. Es difícil medir directamente la fuerza de los puentes de hidrógeno en el agua y en las soluciones, pero se estima que es de unos 20 kJ mol^{-1}. Este valor equivale a la entalpía de formación estándar. Quiere decir que el cambio de entalpía cuando se forman los puentes de hidrógeno es de unos −20 kJ por mol de agua.



$$\Delta H_f = -20 \text{ kJ mol}^{-1} \qquad \textbf{(2.1)}$$

En otras palabras, se producen unos 20 kJ mol^{-1} de calor cuando se forman moléculas de agua con puentes de hidrógeno en agua, bajo condiciones estándar. (Recuérdese que las condiciones estándar, o normales, son 1 atm de presión, 25 °C de temperatura y concentración 1 M de reactivos y productos). Esto equivale a decir que se requieren +20 kJ de energía térmica para romper los puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua —la inversa de la reacción 2.1. Este valor depende del tipo de puente de hidrógeno. En contraste, la energía requerida para romper un enlace covalente O—H en el agua es de unos 460 kJ mol^{-1}, y la necesaria para romper un enlace covalente C—H es de unos 410 kJ mol^{-1}. Por lo anterior, la fuerza de los puentes de hidrógeno es menor al 5% de la fuerza de los enlaces covalentes típicos.

En los puentes de hidrógeno, la orientación es importante. Un puente de hidrógeno es más estable cuando el átomo de hidrógeno y los dos átomos electronegativos asociados a él (los dos átomos de oxígeno, en el caso del agua) forman casi una línea recta. Una sola molécula de agua puede formar puentes de hidrógeno hasta con otras cuatro moléculas de agua (figura 2.4). Puede donar cada uno de sus dos átomos de hidrógeno a otras dos moléculas de agua y puede aceptar dos átomos de hidrógeno de otras dos moléculas de agua. Cada átomo de hidrógeno puede participar sólo en un puente de hidrógeno.

Es difícil estudiar las interacciones tridimensionales del agua líquida, pero se ha aprendido mucho al examinar la estructura de los cristales de hielo (figura 2.5). En la forma común del hielo, cada molécula de agua participa en cuatro puentes de hidrógeno, como es de esperarse. Cada uno de los puentes de hidrógeno apunta al átomo de

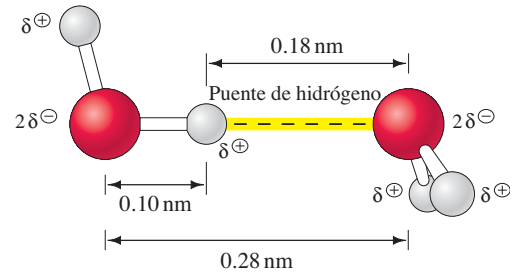


Figura 2.3 ▶
Puentes de hidrógeno entre dos moléculas de agua. Un átomo de hidrógeno parcialmente positivo ($\delta^{\oplus}$) de una molécula de agua atrae al átomo de oxígeno parcialmente negativo ($\delta^{\ominus}$) de una segunda molécula de agua y forma un puente de hidrógeno. Se indican las distancias entre átomos de las dos moléculas de agua en el hielo. Los puentes de hidrógeno se representan con líneas entrecortadas, como se ve aquí y en todo el libro.

oxígeno de una molécula adyacente de agua. Estos cuatro átomos de oxígeno unidos por hidrógenos ocupan los vértices de un tetraedro. Este ordenamiento está de acuerdo con la estructura del agua que se ve en la figura 2.1, donde los cuatro orbitales híbridos sp^3 apuntan a los cuatro vértices de un tetraedro. Se ha estimado que la energía promedio necesaria para romper cada puente de hidrógeno en el hielo es de unos 23 kJ mol^{-1}, por lo que esos puentes son algo más fuertes que los que se forman en el agua.

La capacidad que tienen las moléculas de agua en el hielo para formar cuatro puentes de hidrógeno y la fuerza de éstos determinan que el hielo presente un punto de fusión anormalmente alto. Ello se debe a la gran cantidad de energía que se requiere en forma de calor para destruir la red cristalina del hielo a base de puentes de hidrógeno. Cuando el hielo se funde, la mayor parte de los puentes de hidrógeno se conserva en el agua líquida. Cada molécula de agua líquida puede formar hasta cuatro puentes de hidrógeno con sus vecinas, pero los puentes se distorsionan en comparación con los del hielo, y la estructura del agua líquida es más irregular. La fluidez del agua líquida en comparación con la rigidez del hielo es ante todo una consecuencia del patrón irregular de los puentes de hidrógeno en el agua líquida, que fluctúa constantemente cuando esos puentes se rompen y vuelven a formar. En cualquier momento habrá muchas moléculas de agua que participan en dos, tres o cuatro puentes de hidrógeno con otras moléculas de agua. También habrá muchas que sólo participen en un puente de hidrógeno o en ninguno. La duración promedio de un puente de hidrógeno en el agua es más o menos de 10 picosegundos (10^{-11} s).

La densidad de la mayor parte de las sustancias aumenta al congelarse, cuando se desacelera el movimiento molecular y se forman cristales densamente empacados. La densidad del agua líquida aumenta también a medida que se enfría, hasta que llega a un máximo de 1.000 g ml^{-1} a 4°C (277 K). (Este valor no es una coincidencia. Se *definen* los gramos como el peso de un mililitro de agua a 4°C). Cuando la temperatura baja de 4°C, el agua se dilata. Esta dilatación se debe a la formación del cristal de hielo con más puentes de hidrógeno abiertos, en donde cada molécula de agua está enlazada rígidamente mediante puentes de hidrógeno con otras cuatro. El resultado es que el hielo con su red abierta es un poco menos denso (0.924 g ml^{-1}) que el agua líquida porque las moléculas se pueden mover lo bastante como para empacarse más. Como el hielo es menos denso que el agua flota en ella y el agua se congela desde la superficie hacia la profundidad. Ello conlleva importantes implicaciones biológicas, porque una capa de hielo sobre un estanque aísla contra los fríos extremos a las criaturas vivas que haya abajo.

Hay otras dos propiedades del agua que se relacionan con sus característicos puentes de hidrógeno: su calor específico y su calor de evaporación. El calor específico de una sustancia es la cantidad de calor necesario para elevar 1°C la temperatura de 1 gramo de la sustancia. A esta propiedad también se le llama capacidad calorífica o capacidad térmica. Se requiere una cantidad relativamente grande de calor para aumentar la temperatura del agua porque cada molécula de agua participa en varios puentes de hi-

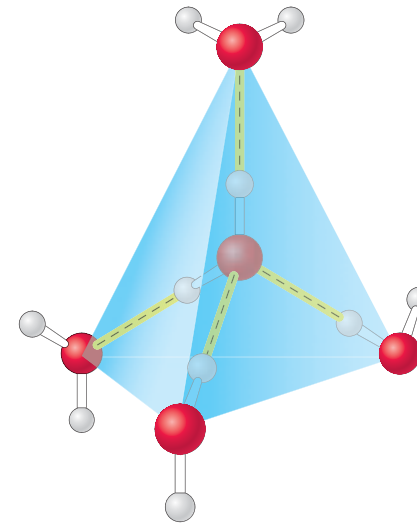
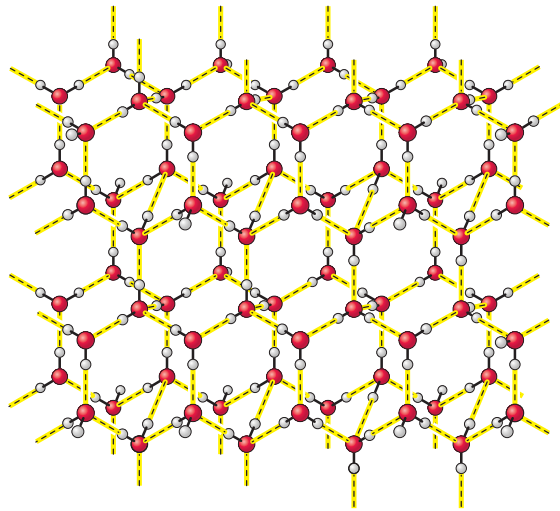


Figura 2.4 ▲
Puentes de hidrógeno en una molécula de agua. Una molécula de agua puede formar hasta cuatro puentes de hidrógeno: el átomo de oxígeno es aceptador de dos puentes con dos átomos de hidrógeno y cada grupo O—H sirve como donador de un hidrógeno.



◀ Figura 2.5
Estructura del hielo. En el hielo, las moléculas de agua forman una red hexagonal abierta donde cada molécula de agua forma un puente de hidrógeno con otras cuatro. La regularidad geométrica de estos puentes de hidrógeno contribuye a la resistencia del cristal de hielo. El patrón de puentes de hidrógeno del agua líquida es más irregular que el del hielo. No se ha determinado la estructura absoluta del agua líquida.

drógeno que deben romperse para que aumente la energía cinética de las moléculas de agua. La abundancia de agua en las células y tejidos de todos los grandes organismos multicelulares evidencia que las fluctuaciones de temperatura dentro de las células se minimizan. Esta propiedad tiene importancia biológica crítica ya que las velocidades de la mayor parte de las reacciones bioquímicas son sensibles a la temperatura.

El calor de evaporación, o de vaporización, del agua también es bastante mayor que el de varios otros líquidos. Se requiere una gran cantidad de calor para convertir el agua de líquido a gas porque deben romperse los puentes de hidrógeno para permitir que se disocien las moléculas de agua, una de otra, para entrar a la fase gaseosa. Ya que la evaporación del agua absorbe tanto calor, la sudación es un mecanismo efectivo para hacer descender la temperatura corporal.

2.3 El agua es un solvente excelente

Las propiedades físicas del agua se combinan para hacerla un excelente solvente. Ya se estudió que las moléculas de agua son polares; esta propiedad ejerce consecuencias importantes, como se verá después. Además, el agua posee una viscosidad intrínseca que no impide mucho el movimiento de las moléculas disueltas en ella. Por último, las moléculas mismas de agua son pequeñas en comparación con las de otros solventes como el etanol y el benceno. El pequeño tamaño de las moléculas de agua determina que muchas de ellas puedan asociarse con partículas de soluto y hacerlas más solubles.

A. Las sustancias iónicas y polares se disuelven en agua

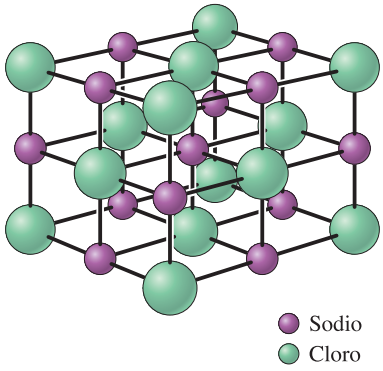
El agua puede interactuar y disolver otros compuestos polares y compuestos que se ionizan. La ionización se relaciona con la ganancia o pérdida de un electrón, que da lugar a un átomo o a un compuesto que presenta una carga neta. Las moléculas que se pueden disociar y formar iones se llaman **electrólitos**. Las sustancias que se disuelven con facilidad en agua se llaman **hidrofílicas** o amantes del agua. (Las sustancias hidrofóbicas, que odian al agua, se describen en la próxima sección).

¿Por qué los electrólitos son solubles en agua? Recuérdese que las moléculas de agua son polares, lo cual significa que se pueden alinear entre sí, en torno a los electrólitos, para que los átomos negativos de oxígeno en las moléculas de agua se orienten hacia los **cationes** (iones con carga positiva) de los electrólitos, y los átomos positivos de hidrógeno se orienten hacia los **aniones** (átomos con carga negativa). Imagínese lo que sucede cuando un cristal de cloruro de sodio (NaCl) se disuelve en agua (figura 2.6). Las moléculas polares de agua son atraídas hacia los iones cargados en el cristal. Las atracciones hacen que los iones sodio y cloruro, en la superficie del cristal, se disocien entre sí y que el cristal comience a disolverse. Como hay muchas moléculas polares de agua rodeando a cada ion sodio y cloro disueltos, las interacciones entre las cargas eléctricas opuestas de esos iones son mucho más débiles que lo que hay en el cristal intacto. El resultado de sus interacciones con moléculas de agua es que los iones del cristal se continúen disociando hasta que la solución se satura. En este momento, los iones del electrólito disuelto están presentes en concentraciones suficientemente altas para que se vuelvan a unir al electrólito sólido, cristalizándose, hasta que se establece el equilibrio entre disociación y cristalización.

Cada $Na^{\oplus}$ disuelto atrae a los extremos negativos de varias moléculas de agua, mientras que cada $Cl^{\ominus}$ disuelto atrae a los extremos positivos de varias moléculas de agua (figura 2.6b). La esfera de moléculas de agua que rodea a cada ion se llama esfera de solvatación y suele contener varias capas de moléculas de solvente. Se dice que una molécula o ion que está rodeado por moléculas de solvente está solvatada o solvatado. Cuando el solvente es agua, se dice que las moléculas o los iones están hidratados.

Los electrólitos no son las únicas sustancias hidrofílicas que son solubles en agua. Toda molécula polar también exhibirá una tendencia a solvatarse por moléculas de agua. Además, la solubilidad de muchas moléculas orgánicas aumenta por la formación de puentes de hidrógeno con las moléculas de agua. Los compuestos orgánicos iónicos,

a) Cristal de NaCl



b)

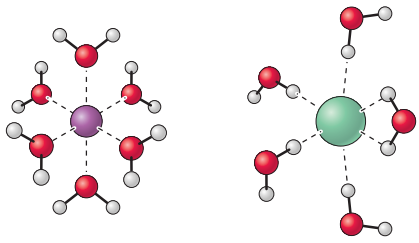


Figura 2.6 ▲
Disolución de cloruro de sodio (NaCl) en agua. **a)** Los iones del cloruro de sodio cristalino se mantienen unidos por fuerzas electrostáticas. **b)** El agua debilita las interacciones entre los iones positivos y negativos y el cristal se disuelve. Cada $Na^{\oplus}$ y cada $Cl^{\ominus}$ están rodeados por una esfera de solvatación. Sólo se muestra una capa de moléculas de solvente. Las interacciones entre iones y moléculas de agua se representan con líneas entrecortadas.

como los carboxilatos y las aminas protonadas, deben su solubilidad en agua a sus grupos funcionales polares. Otros grupos que confieren solubilidad en agua incluyen los amino, hidroxilo y carbonilo. Las moléculas que contienen esos grupos se dispersan entre las moléculas de agua y sus grupos polares forman puentes de hidrógeno con el agua.

La cantidad de grupos polares en una molécula afecta su solubilidad en agua. También la solubilidad depende de la relación entre grupos polares y no polares en una molécula. Por ejemplo, los alcoholes con uno, dos o tres carbonos son miscibles con agua, pero con cadenas largas hidrocarbonadas, con un solo grupo hidroxilo, son mucho menos solubles en agua (tabla 2.1). En las moléculas más grandes, las propiedades de la parte hidrocarbonada no polar de la molécula superan a las del grupo alcohol polar y limitan la solubilidad.

Al aumentar la cantidad de grupos polares en una molécula orgánica, se incrementa su solubilidad en el agua. Por ejemplo, el carbohidrato glucosa contiene cinco grupos hidroxilo y un oxígeno en el anillo (figura 2.7) y es muy soluble en agua (83 gramos de glucosa se pueden disolver en 100 mililitros de agua a 17.5°C). Cada átomo de oxígeno en la glucosa puede formar puentes de hidrógeno con el agua. En otros capítulos habrá ocasión de ver que la unión de los carbohidratos a algunas moléculas poco solubles como los líquidos y las bases de nucleósidos, aumenta su solubilidad.

TABLA 2.1 Solubilidades de alcoholes de cadena corta en agua

Alcohol	Estructura	Solubilidad en agua (mol/100 g H_2O a 20°C)[a]
Metanol	CH_3OH	∞
Etanol	CH_3CH_2OH	∞
Propanol	$CH_3(CH_2)_2OH$	∞
Butanol	$CH_3(CH_2)_3OH$	0.11
Pentanol	$CH_3(CH_2)_4OH$	0.030
Hexanol	$CH_3(CH_2)_5OH$	0.0058
Heptanol	$CH_3(CH_2)_6OH$	0.0008

[a] Infinito (∞) quiere decir que no hay límite a la solubilidad del alcohol en el agua.

B. Concentraciones celulares y difusión

El interior de una célula puede estar muy apretado, como sugieren los dibujos de Goodsell (figura 1.17). El comportamiento de los solutos en el citoplasma es distinto del que tienen en una sencilla solución en agua. Una de las diferencias más importantes es la reducción de la velocidad de difusión dentro de las células.

Hay tres razones por las que los solutos se disuelven con más lentitud en las células.

1. La viscosidad del citoplasma es mayor que la del agua, lo que se debe a la presencia de numerosos solutos, como los azúcares. De acuerdo con mediciones recientes parece que la viscosidad del citoplasma sólo es un poco mayor que la del agua, aun en los organelos empacados densamente.
2. Las moléculas con carga se enlazan momentáneamente entre sí dentro de las células y ello restringe su movilidad. Dichas consecuencias de la unión ejercen un efecto pequeño, pero apreciable, sobre las tasas de difusión.
3. Los choques con moléculas de agua inhiben la difusión a causa de un efecto que se denomina *hacinamiento molecular*. Es la principal razón por la que se desacelera la difusión en el citoplasma.

Para las moléculas pequeñas, la velocidad de difusión dentro de las células es más o menos la cuarta parte de la que muestran en agua pura. Para las moléculas grandes, como las de proteínas, la tasa de difusión en el citoplasma disminuye hasta a 5-10% de la velocidad en agua. Esta desaceleración se debe en gran parte al hacinamiento molecular.

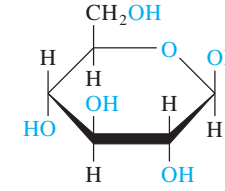


Figura 2.7 ▲
Estructura de la glucosa. La glucosa contiene cinco grupos hidroxilo y un oxígeno en el anillo; cada uno de ellos puede formar puentes de hidrógeno con el agua.

C. Presión osmótica

Si una membrana permeable al solvente separa a dos soluciones que contienen concentraciones distintas de sustancias disueltas, o solutos, las moléculas del solvente se difundirán desde la solución menos concentrada hacia la más concentrada en un proceso llamado **ósmosis**. La presión necesaria para evitar este flujo de solvente se llama **presión osmótica**. La presión osmótica de una solución depende de la concentración molar total del soluto y no de su naturaleza química.

En las células vivas, las membranas permeables al agua separan al citosol del medio externo. Las composiciones de las soluciones intracelulares son bastante distintas de las de las soluciones extracelulares, y unos compuestos se concentran más y otros menos dentro de las células. En general, las concentraciones de los solutos dentro de la célula son mucho mayores que sus concentraciones en el ambiente acuoso fuera de la célula. Las moléculas de agua tienden a atravesar la membrana celular para entrar a la célula y diluir

la solución en el interior de ésta. Ese movimiento es impedido por la membrana celular, que resiste el aumento de volumen que causaría ese influjo de agua. En algunos casos, el tamaño y la forma de la célula se refuerza con una pared celular rígida.

Las células recurren a varias estrategias para evitar que la presión osmótica se vuelva tan grande que las haga explotar. Una estrategia consiste en condensar muchas moléculas individuales y formar una macromolécula. Por ejemplo, las células animales que almacenan glucosa la empacan como polímero, llamado glucógeno, que contiene unos 50000 residuos de glucosa. Si las moléculas de glucosa no se condensaran y formaran una sola molécula de glucógeno, el influjo de agua necesario para disolver cada molécula de glucosa haría que la célula se hinchara y explotara.

2.4 Las sustancias no polares son insolubles en agua

Los hidrocarburos y otras sustancias no polares presentan una solubilidad muy baja en agua porque las moléculas de agua tienden a interactuar con otras moléculas de agua y no con moléculas no polares. El resultado es que las moléculas de agua excluyen a las sustancias no polares forzándolas a asociarse entre sí. Por ejemplo, las gotas diminutas de aceite que se dispersan en forma vigorosa en agua tienden a coalescer y formar una sola gota, con lo cual minimizan la superficie de contacto entre las dos sustancias. Es la explicación por la que se separa el aceite en un aderezo para ensalada si se deja en reposo durante algún tiempo antes de agregarlo en la ensalada.

Se dice que las moléculas no polares son **hidrofóbicas** (que "odian" al agua) y a este efecto de exclusión de sustancias no polares por parte del agua se le llama **efecto hidrofóbico**. El efecto hidrofóbico es crítico para el plegamiento de las proteínas y el autoensamblaje de las membranas biológicas.

Los detergentes, a los que a veces se les llama surfactantes o agentes tensoactivos, son moléculas que son hidrofílicas e hidrofóbicas a la vez; en general cuentan con una cadena hidrofóbica de al menos 12 átomos de carbono de longitud y un extremo iónico o polar. Se dice que esas moléculas son **anfipáticas**. Los jabones, que son sales de metales alcalinos y ácidos grasos de cadena larga, representan una clase de detergente. El jabón palmitato de sodio (CH_3 $(CH_2)_{14}COO^{\ominus}Na^{\oplus}$), por ejemplo, contiene un grupo carboxilato hidrofílico y una cola hidrofóbica. Uno de los detergentes sintéticos que se usa con más frecuencia en bioquímica es el dodecilsulfato de sodio (SDS, de *sodium dodecyl sulfate*), que contiene una cola con 12 carbonos y un grupo sulfato polar (figura 2.8). La parte de hidrocarburo en un detergente es soluble en sustancias orgánicas no polares, mientras que su grupo polar es soluble en agua. Cuando un detergente se esparce con suavidad sobre la superficie del agua se forma una monocapa insoluble, donde las colas hidrofóbicas y no polares de las moléculas del detergente se extienden hacia el aire, mientras que las cabezas hidrofílicas y iónicas se hidratan y penetran en el agua (figura 2.9). Cuando una concentración suficientemente alta del detergente se dispersa en agua, más que estratificarse en la superficie, los grupos de moléculas del detergente se agrupan y forman micelas. En una forma frecuente de micelas, las colas no polares de las moléculas del detergente se asocian entre sí en el centro de la estructura y minimizan el contacto con las moléculas de agua. Como las colas son flexibles, el núcleo de una micela es hidrocarburo líquido. Las cabezas iónicas entran en la solución acuosa y en consecuencia se hidratan. Las micelas pequeñas y compactas pueden contener de unas 80 a 100 moléculas del detergente.

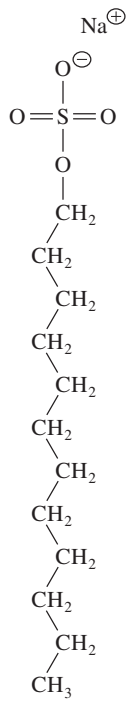
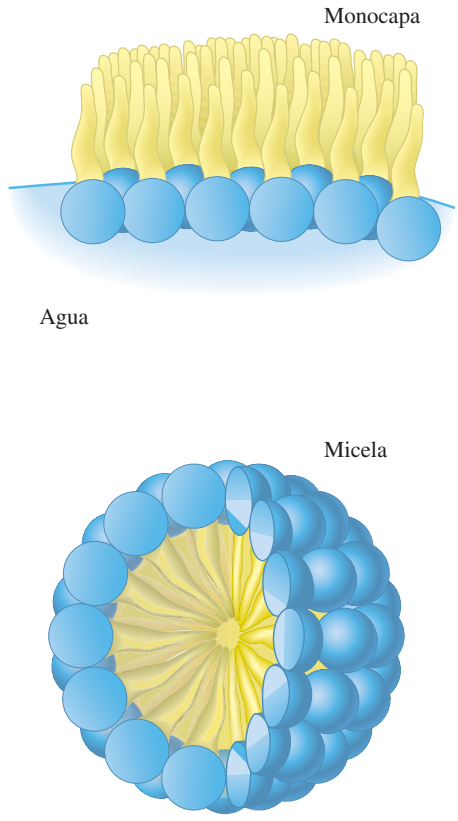


Figura 2.8 ▲
Docecilsulfato de sodio (SDS, de *sodium dodecyl sulfate*), detergente sintético.

La acción limpiadora de los jabones y demás detergentes se deriva de su capacidad de atrapar la grasa y los aceites, insolubles en agua, en los interiores hidrofóbicos de las micelas. El SDS y los detergentes sintéticos similares son ingredientes activos comunes en detergentes para lavandería. La suspensión de compuestos no polares en agua, por su incorporación a las micelas, se llama solubilización, que no es lo mismo que disolución. Varias estructuras que se encontrarán después en este libro, como proteínas y membranas biológicas, se asemejan a las micelas por exhibir interiores hidrofóbicos y superficies hidrofílicas.

Algunos iones disueltos, como $SCN^{\ominus}$ (tiocianato) y $ClO_4^{\ominus}$ (perclorato) se llaman caótropos. Dichos iones se solvatan mal en comparación con iones como $NH_4^{\oplus}$, $SO_4^{\ominus}$



◀ Figura 2.9
Cortes de las estructuras que forman los detergentes en agua. Los detergentes pueden formar monocapas en la interfase aire-agua. Pueden formar también micelas, que son agregados de moléculas del detergente en que las colas del hidrocarburo se asocian en el interior, sin agua, y los grupos polares en las cabezas están hidratados.

y $H_2PO_4^{\ominus}$. Los caótropos aumentan la solubilidad en agua de compuestos no polares porque desordenan a las moléculas de agua (no hay acuerdo general sobre la forma en que lo hacen). Habrá oportunidad de conocer otros ejemplos de agentes caotrópicos, como el ion guanidinio y el compuesto urea, no iónico, cuando se describa la desnaturalización y las estructuras tridimensionales de las proteínas y ácidos nucleicos.

2.5 Interacciones no covalentes

Hasta ahora en este capítulo se presentaron dos clases de interacciones no covalentes: puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Interacciones débiles como éstas juegan papeles de extrema importancia en las estructuras y funciones de las macromoléculas. Por ejemplo, las fuerzas débiles son las responsables de estabilizar las estructuras de las proteínas y de los ácidos nucleicos. También las fuerzas débiles intervienen en el reconocimiento de una macromolécula por parte de otra y en la unión de los reactivos a las enzimas. En realidad hay cuatro enlaces o fuerzas no covalentes principales que intervienen en la estructura y la función de las biomoléculas. Además de los puentes de hidrógeno y la hidrofobicidad, también hay interacciones entre carga y carga, y fuerzas de van der Waals. Las interacciones entre carga y carga, los puentes de hidrógeno y las fuerzas de van der Waals son variaciones de una clase más general de fuerza y se llaman **interacciones electrostáticas**.

A. Interacciones carga-carga

Las **interacciones carga-carga** (o entre cargas) son interacciones electrostáticas entre dos partículas cargadas. Esas interacciones son potencialmente las fuerzas no covalentes más grandes y se pueden extender a mayores distancias que otras interacciones no cova-

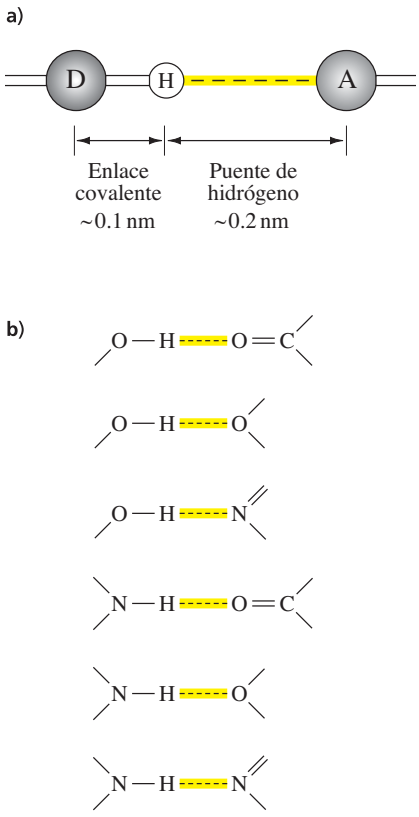
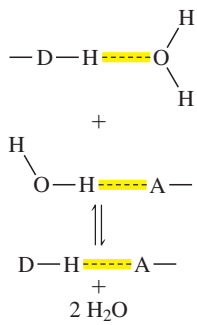


Figura 2.10 ▲
a) Puentes de hidrógeno entre un grupo —D—H (el donador de hidrógeno) y un átomo A electronegativo (el aceptor de hidrógeno). Un puente de hidrógeno característico tiene unos 0.2 nm de longitud, más o menos dos veces la longitud del enlace covalente entre un átomo de hidrógeno y átomos de nitrógeno, oxígeno o azufre. La distancia total entre los dos átomos electronegativos que participan en un puente de hidrógeno es, entonces, de unos 0.3 nm. **b)** Ejemplos de puentes de hidrógeno importantes en biología.



▲Los puentes de hidrógeno entre o dentro de las macromoléculas bioquímicas compiten con el agua.

lentes. La estabilización de los cristales de NaCl por atracción interiónica es un ejemplo de una interacción entre cargas. La fuerza de estas interacciones en solución depende de la naturaleza del solvente. Como se hizo notar ya, el agua debilita mucho esas interacciones. En consecuencia, la estabilidad de los polímeros biológicos en un ambiente acuoso no depende tanto de las interacciones carga-carga, pero dichas interacciones sí desempeñan un papel en el reconocimiento de una molécula por parte de otra. Por ejemplo, la mayor parte de las enzimas presenta sitios aniónicos o catiónicos que se unen a reactivos con carga opuesta. A veces, a la atracción entre grupos funcionales de proteínas con carga opuesta se le llama puentes salinos. Un puente salino sepultado en el interior hidrofóbico de una proteína es más fuerte que uno que se halla en la superficie (aunque no es tan fuerte como uno en un cristal de sal) porque las moléculas de agua no pueden romperlo. El término más adecuado para denominar esas interacciones se llama **apareamiento de iones**. Las interacciones carga-carga también explican la repulsión mutua de grupos iónicos con carga similar. La repulsión de carga puede afectar las estructuras de biomoléculas individuales y también sus interacciones con otras moléculas de carga semejante.

B. Puentes de hidrógeno

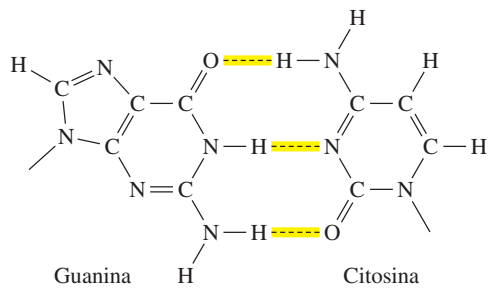
Los puentes de hidrógeno, que también son una clase de interacción electrostática, existen en muchas macromoléculas y se encuentran entre las fuerzas no covalentes mayores en los sistemas biológicos. Las fuerzas de los puentes de hidrógeno, como los que hay entre sustratos y enzimas, son las que existen entre las bases de ADN y se estima son de unos 2 a 7.5 kJ mol^{-1}. Esos puentes de hidrógeno son bastante más débiles que los del hielo, que necesitan 23 kJ mol^{-1} para romperse. Los puentes de hidrógeno en las moléculas bioquímicas encierran fuerza suficiente para conferir estabilidad estructural, pero son lo bastante débiles como para romperse con facilidad.

En general, cuando un átomo de hidrógeno está unido de forma covalente a un átomo fuertemente electronegativo como el de nitrógeno, oxígeno o azufre, se puede formar un puente de hidrógeno cuando el átomo de hidrógeno está a 0.2 nm, aproximadamente, de otro átomo fuertemente electronegativo que disponga de un par de electrones sin compartir. Como se describió antes en el caso de los puentes de hidrógeno entre moléculas de agua, el átomo unido en forma covalente (indicado con D en la figura 2.10a) es el donador de hidrógeno y el átomo que atrae los protones (designado como A en la figura 2.10a) es el aceptador de hidrógeno. La distancia total entre los dos átomos electronegativos que participan en un puente de hidrógeno suele ser de entre 0.27 nm y 0.30 nm. En la figura 2.10b se ven algunos ejemplos comunes de puentes de hidrógeno.

Un puente de hidrógeno tiene muchas de las características de un enlace covalente, pero es mucho más débil. El lector puede imaginar que un puente de hidrógeno es una repartición parcial de electrones. (Recuérdese que en un enlace covalente verdadero se comparte un par de electrones entre dos átomos). Los tres átomos que intervienen en un puente de hidrógeno suelen alinearse para formar una recta, donde el centro de los átomos de hidrógeno queda directamente en una línea trazada entre los dos átomos electronegativos. Se permiten pequeñas desviaciones en este alineamiento, pero en ese caso los puentes de hidrógeno son todavía más débiles que en su forma normal.

Todos los grupos funcionales que se ven en la figura 2.10 también son capaces de formar puentes de hidrógeno con moléculas de agua. De hecho, cuando están expuestos al agua, es mucho más probable que interactúen con moléculas de agua, por ser tan grande la concentración del agua. Para que se formen puentes de hidrógeno entre o dentro de macromoléculas bioquímicas, los grupos donador y aceptor deben estar protegidos contra el agua. En la mayor parte de los casos este blindaje se da porque los grupos están sepultados en el interior hidrofóbico de la macromolécula, donde no puede penetrar el agua. Por ejemplo, en el ADN, los puentes de hidrógeno entre los pares de bases complementarias están en el medio de la doble hélice (figura 2.11).

Bajo ciertas condiciones se pueden romper los puentes intramoleculares de hidrógeno en una macromolécula y los grupos funcionales formarán puentes de hidrógeno con el agua. Ello puede modificar en forma importante la estructura de la macromolécula. Se dice que una macromolécula cuya estructura ha sido cambiada en esta forma es o está desnaturalizada.



◀ Figura 2.11
Puentes de hidrógeno entre las bases complementarias guanina y citosina, en el ADN.

C. Fuerzas de van der Waals

Otra fuerza débil se debe a las interacciones entre los dipolos permanentes de dos enlaces polarizados sin carga, o las interacciones entre un dipolo permanente y un dipolo transitorio, inducido en una molécula vecina. Esas fuerzas son de corto alcance y su magnitud es pequeña, de unos 1.3 kJ mol^{-1} y 0.8 kJ mol^{-1}, respectivamente.

Las interacciones electrostáticas transitorias o momentáneas causan fuerzas intermoleculares débiles entre todos los átomos neutros. Esas **fuerzas de van der Waals,** bautizadas en honor de Johannes Diderik van der Waals, físico holandés, sólo se producen cuando los átomos están muy cercanos entre sí. Las fuerzas de van der Waals son tanto de atracción como de repulsión. Las fuerzas de atracción, que también se llaman fuerzas de dispersión de London, se originan en el dipolo infinitesimal generado en los átomos por el movimiento aleatorio de los electrones con carga negativa en torno a los núcleos con carga positiva. Así, las fuerzas de van der Waals son atracciones dipolares o electrostáticas entre los núcleos de átomos o moléculas y los electrones de otros átomos o moléculas. La intensidad de la interacción entre los dipolos inducidos en forma transitoria de moléculas no polares como las de metano es de unos 0.4 kJ mol^{-1} a una separación internuclear de 0.3 nm. Aunque operan a distancias similares, las fuerzas de van der Waals son mucho más débiles que los puentes de hidrógeno.

También hay un componente de repulsión en las fuerzas de van der Waals. Cuando dos átomos se aprietan uno contra el otro, los electrones en sus orbitales se repelen entre sí. La repulsión aumenta en forma exponencial a medida que los átomos son comprimidos uno con otro y se vuelve muy intensa cuando están muy cerca uno del otro.

La suma de los componentes de atracción y repulsión de las fuerzas de van der Waals da como resultado un perfil de energía como el de la figura 2.12. Obsérvese que a grandes distancias intermoleculares los dos átomos no interaccionan y no hay fuerzas de atracción o repulsión entre ellos. A medida que los átomos se acercan entre sí (avanzando hacia la izquierda en el diagrama) aumenta la fuerza de atracción. Esta fuerza de atracción se debe a la deslocalización de la nube electrónica que rodea a los átomos. El lector puede imaginar que se trata de un desplazamiento de electrones en torno a uno de los átomos, de tal manera que los electrones tienden a ubicarse en el lado contrario al del átomo que se acerca. Este desplazamiento produce un dipolo local, donde un lado del átomo tiene una pequeña carga positiva y el otro lado presenta una carga negativa pequeña. El lado que exhibe la pequeña carga positiva atrae al otro átomo con carga negativa. A medida que los átomos se aproximan más entre sí, disminuye el efecto de este dipolo y adquiere más importancia la influencia general de la nube de electrones con carga negativa. A cortas distancias, los átomos se repelen entre sí.

La distancia óptima de empaquetamiento es el punto en el que son máximas las fuerzas de atracción. Esa distancia corresponde a la hondonada de energía en la figura 2.12 y es igual a la suma de los radios de van der Walls de los dos átomos. Cuando los átomos están separados por la suma de sus dos radios de van der Waals se dice que están en contacto de van der Waals. En la tabla 2.2 se ven radios de van der Waals típicos de diversos átomos.

En algunos casos, el desplazamiento de los electrones se ve influido por el acercamiento de otro átomo. Eso se llama dipolo inducido. En otros casos, la deslocalización de los electrones es una propiedad permanente de la molécula, como se explicó en el caso del agua (sección 2.1). También estos dipolos permanentes dan origen a fuerzas de van der Waals.

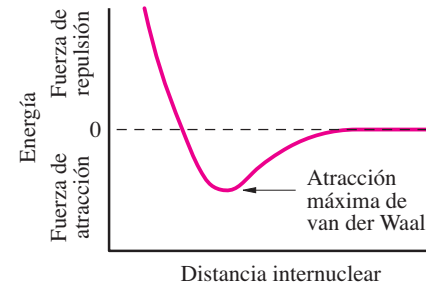


Figura 2.12 ▲
Efecto de la separación molecular sobre las fuerzas de van der Waals. Estas fuerzas son fuertemente repulsivas a pequeñas distancias internucleares y muy débiles de atracción a distancias internucleares grandes. Cuando dos átomos están separados por la suma de sus radios de van der Waals, la atracción de van der Waals es máxima.

TABLA 2.2 Radios de van der Waals de diversos átomos

Átomo	Radio (nm)
Hidrógeno	0.12
Oxígeno	0.14
Nitrógeno	0.15
Carbono	0.17
Azufre	0.18
Fósforo	0.19

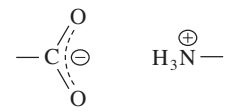
Aunque las fuerzas de van der Waals individuales son débiles, el hacinamiento de átomos dentro de una proteína, un ácido nucleico o una membrana biológica permite la formación de una gran cantidad de esas interacciones débiles. Una vez formadas, dichas fuerzas débiles acumulativas juegan papeles importantes en el mantenimiento de las estructuras de las moléculas. Por ejemplo, las bases heterocíclicas de los ácidos nucleicos se apilan una sobre otra en el ADN de doble cadena. Este orden se halla estabilizado por una diversidad de interacciones no covalentes, en especial fuerzas de van der Waals. A esas fuerzas se les llama, en forma colectiva, interacciones de apilamiento (véase el capítulo 19).

D. Interacciones hidrofóbicas

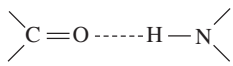
La asociación de una molécula o grupo relativamente no polar con otras moléculas no polares se llama **interacción hidrofóbica**. Si bien a las interacciones hidrofóbicas a veces se les llama "*enlaces*" esta descripción es incorrecta. Las moléculas o grupos no polares tienden a agregarse en solución acuosa no por la atracción mutua sino porque las moléculas polares de agua atrapadas en torno a los compuestos no polares tienden a asociarse entre sí y no con las moléculas no polares (sección 2.4). Por ejemplo, las micelas (figura 2.9) se estabilizan por interacciones hidrofóbicas. El patrón de puentes de hidrógeno en el agua se interrumpe por la presencia de una molécula no polar. Las moléculas de agua que rodean a una molécula menos polar en solución tienen más restringidas sus interacciones con otras moléculas de agua. Esas moléculas restringidas de agua son relativamente inmóviles, u ordenadas, de la misma manera que están ordenadas las moléculas en la superficie del agua en el fenómeno conocido como tensión superficial. Pese a ello, las moléculas de agua en el interior de la fase de solvente son mucho más móviles o desordenadas. En términos termodinámicos hay una ganancia neta de entropía combinada del solvente y del soluto no polar cuando los grupos no polares se agrupan y el agua se libera de su estado ordenado en torno a los grupos no polares. Las interacciones hidrofóbicas, al igual que los puentes de hidrógeno, son mucho más débiles que los enlaces covalentes. Por ejemplo, la energía necesaria para transferir un grupo —CH_2— de un ambiente hidrofóbico a uno acuoso es de unos 3 kJ mol^{-1}.

El efecto acumulado de muchas interacciones hidrofóbicas puede ser apreciable sobre la estabilidad de una macromolécula. Por ejemplo, la naturaleza tridimensional de la mayor parte de las proteínas está determinada en gran parte por las interacciones hidrofóbicas formadas durante el plegamiento espontáneo de una cadena de polipéptido. Las moléculas de agua se unen a la superficie externa de la proteína, pero no pueden penetrar al interior, donde se halla la mayor parte de los grupos no polares.

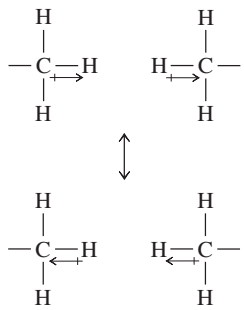
Todas las interacciones que se describen aquí son débiles, individualmente, en comparación con los enlaces covalentes, pero el efecto combinado de muchas de estas interacciones débiles puede ser importante. Las interacciones no covalentes más importantes en las biomoléculas se ven en la figura 2.13.



Interacción entre cargas
~40 a 200 kJ mol^{-1}



Puente de hidrógeno
~2 a 20 kJ mol^{-1}



Interacción de van der Waals
~0.4 a 4 kJ mol^{-1}

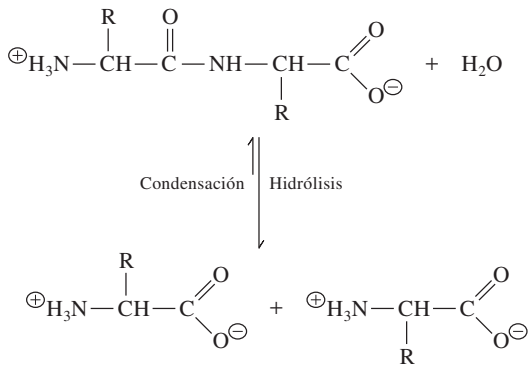
Interacción hidrofóbica
~3 a 10 kJ mol^{-1}

Figura 2.13 ▲
Interacciones no covalentes típicas en las moléculas. Las interacciones entre cargas, los puentes de hidrógeno y las de van der Waals son electrostáticas. Las interacciones hidrofóbicas dependen de la mayor entropía de las moléculas de agua vecinas, no de la atracción directa entre grupos no polares. Para comparar, la energía de disociación de un enlace covalente, como el C—H o el C—C, es de unos 340 a 450 kJ mol^{-1}.

2.6 El agua es nucleofílica

Además de sus propiedades físicas, las propiedades químicas del agua también son importantes en bioquímica, porque las moléculas de agua pueden reaccionar con moléculas biológicas. El átomo de oxígeno, rico en electrones, determina gran parte de la reactividad del agua en las reacciones químicas. A las sustancias ricas en electrones se les llama **nucleófilos** ("amantes" del núcleo) porque buscan especies con carga positiva, o con deficiencia en electrones, llamadas **electrófilos** ("amantes" del electrón). Los nucleófilos pueden tener carga negativa o contar con pares no compartidos de electrones. Atacan a los electrófilos durante reacciones de sustitución o de adición. Los átomos nucleófilos más comunes en biología son de oxígeno, nitrógeno, azufre y carbono.

El átomo de oxígeno en el agua tiene dos pares de electrones no compartidos y por ello es nucleofílico. Aunque el agua es un nucleófilo relativamente débil, su concentración celular es tan alta que cabe esperar que muchas macromoléculas sean degradadas fácilmente por el ataque nucleofílico del agua. Esa expectativa, de hecho, es correcta.



◀ Figura 2.14
Hidrólisis de un péptido. En presencia de agua, se hidrolizan los enlaces peptídicos en las proteínas y los péptidos. La condensación, que es la inversa de la hidrólisis, no se favorece termodinámicamente.

Por ejemplo, las proteínas se pueden hidrolizar o degradar por el agua para liberar sus unidades monómeras, que son los aminoácidos (figura 2.14). El equilibrio de la hidrólisis completa de una proteína está muy orientado hacia la dirección de la degradación; en otras palabras, en presencia de agua, el destino final de todas las proteínas es ¡su destrucción por hidrólisis!

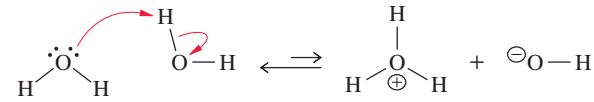
Si hay tanta agua en las células ¿por qué todos los biopolímeros no se degradan con rapidez y quedan sus componentes? De igual modo, si el equilibrio está hacia la descomposición ¿cómo es que hay biosíntesis en un medio acuoso? Las células resuelven estos problemas de diversas maneras. Las uniones entre las unidades monómeras de las macromoléculas, como los enlaces amida en las proteínas y las uniones éster en el ADN, son relativamente estables en solución, al pH y la temperatura celulares. En este caso, la estabilidad de los enlaces se refiere a su velocidad de hidrólisis en el agua y no a su estabilidad termodinámica. Las propiedades químicas del agua, junto con su alta concentración, determinan que su cambio de energía libre de Gibbs sea negativo para la hidrólisis (ΔG). Ello significa que la reacción de hidrólisis es favorable termodinámicamente (es decir, espontánea). Sin embargo, la velocidad de reacción dentro de la célula es tan lenta que las macromoléculas no se degradan en forma apreciable por hidrólisis espontánea durante la vida promedio de una célula. Es importante tener en mente la distinción entre la dirección preferida de una reacción, indicada por el cambio de energía libre de Gibbs, y la velocidad de la reacción, representada por la constante de velocidad (sección 1.3).

Las células pueden sintetizar macromoléculas en un ambiente acuoso aunque las reacciones de condensación —lo inverso de la hidrólisis— sean desfavorables termodinámicamente. Lo hacen usando la energía química potencial del ATP (de *adenosine triphosphate*, trifosfato de adenosina) para superar una barrera termodinámica desfavorable. Las enzimas que catalizan dichas reacciones excluyen al agua del sitio activo donde tienen lugar las reacciones de síntesis. Debido a que las reacciones de síntesis deben proceder contra equilibrios muy desfavorables, siguen rutas químicas en dos pasos, diferentes de la inversión de la hidrólisis. La ruta sencilla de condensación que se observa en la figura 2.14 no es la que utilizan las células vivas porque la presencia de altas concentraciones de agua hace que la reacción de condensación resulte en extremo desfavorable. En el primer paso de la síntesis, que termodinámicamente es cuesta arriba, la molécula que se va a transferir reacciona con ATP y forma un intermediario reactivo. En el segundo paso el grupo activado se transfiere con facilidad al nucleófilo atacante. En el capítulo 22 se estudiará que el intermediario reactivo en la síntesis de proteína es un aminoacilo-ARNt que se forma en una reacción que requiere ATP. El resultado neto de la reacción de biosíntesis es acoplar la condensación a la hidrólisis de ATP.

2.7 Ionización del agua

Una de las propiedades importantes del agua es su pequeña tendencia a ionizarse. El agua pura no está formada sólo por H_2O, sino también por una baja concentración de iones hidronio ($H_3O^{\oplus}$) y una concentración igual de iones hidróxido ($OH^{\ominus}$). Los iones

hidronio e hidróxido se forman por un ataque nucleofílico del oxígeno contra uno de los protones en una molécula adyacente de agua.



(2.2)

$$H_2O + H_2O \rightleftharpoons H_3O^{\oplus} + OH^{\ominus}$$

Las flechas en la reacción 2.2 indican el movimiento de pares de electrones. Se usan esas flechas para indicar mecanismos de reacción, un tipo de diagrama que será tan común como frecuente en este libro. Uno de los pares libres de electrones del oxígeno contribuye a la formación de un nuevo enlace covalente O—H entre el átomo de oxígeno del ion hidronio y un protón ($H^{\oplus}$) extraído de una molécula de agua. En esta reacción se rompe un enlace covalente O—H y el par de electrones de ese enlace queda asociado con el átomo de oxígeno del ion hidróxido.

Obsérvese que los átomos del ion hidronio contienen once protones con carga positiva (ocho en el átomo de oxígeno y tres protones de hidrógeno) y diez electrones con carga negativa (un par de electrones libres asociados al átomo de oxígeno y tres pares en cada uno de los enlaces covalentes). Eso da como resultado una carga neta positiva y es por lo que se le llama ion. Se acostumbra a representar la carga positiva como si estuviera asociada al átomo de oxígeno, pero en realidad también se distribuye de modo parcial entre los átomos de hidrógeno. De forma similar, el ion hidróxido posee una carga neta negativa porque contiene diez electrones, mientras que los núcleos de los átomos de oxígeno e hidrógeno cuentan sólo con un total de nueve protones con carga positiva.

La reacción de ionización es una reacción reversible típica. Las reacciones de protonación y desprotonación son muy rápidas. Los iones hidróxido tienen corta duración en el agua, al igual que los iones hidronio. Hasta las mismas moléculas de agua presentan sólo una existencia transitoria. Se cree que la molécula promedio de agua sólo existe aproximadamente un milisegundo (10^{-3} s) antes de perder un protón para convertirse en ion hidróxido, o ganar un protón para transformarse en un ion hidronio. Obsérvese que la duración de una molécula de agua todavía es nueve órdenes de magnitud (10^9) mayor que la duración de un puente de hidrógeno.

Aunque muchas veces se representa un ion hidronio en la forma $H_3O^{\oplus}$, en realidad dispone de varias moléculas de agua relacionadas con él. Los iones hidronio son capaces de donar un protón a otro ion. Esos donadores de protones se llaman ácidos, de acuerdo con el concepto de ácidos y bases de Brønsted-Lowry. Con frecuencia el ion hidronio se representa por $H^{\oplus}$ (protón libre, o ion hidrógeno) para reflejar que es una fuente principal de protones en reacciones químicas. La ionización del agua se puede representar entonces como una disociación simple de un protón a partir de una sola molécula de agua.

$$H_2O \rightleftharpoons H^{\oplus} + OH^{\ominus} \qquad \textbf{(2.3)}$$

La reacción 2.3 es una forma cómoda de indicar la ionización del agua, pero no refleja la estructura del donador de protón, que en realidad es el ion hidronio. La reacción 2.3 también oculta el hecho de que la ionización del agua en realidad es una reacción bimolecular donde intervienen dos moléculas separadas de agua, como indica la reacción 2.2. Por fortuna, la disociación del agua es una aproximación razonable que no afecta los cálculos ni la comprensión de las propiedades del agua. Esta hipótesis se emplea en el resto de este libro.

Los iones hidróxido pueden aceptar un protón y convertirse de nuevo en moléculas de agua. A los aceptores de protones se les llama **bases**. Como indica la reacción 2.2, el agua puede funcionar como un ácido o como una base.

La ionización del agua se puede analizar cuantitativamente. Recuérdese que las concentraciones de reactivos y productos en una reacción deben llegar al equilibrio. La relación de esas concentraciones define a la constante de equilibrio (K_{eq}). En el caso de la ionización del agua

$$K_{eq} = \frac{[H^{\oplus}][OH^{\ominus}]}{H_2O} \qquad K_{eq}(55.5\ M) = [H^{\oplus}][OH^{\ominus}] \tag{2.4}$$

Se ha determinado la constante de equilibrio para la ionización del agua bajo condiciones normales de presión (1 atm) y de temperatura (25°C); su valor es de 1.8×10^{-16} M. Interesa conocer las concentraciones de protones y de iones hidróxido en una solución de agua pura ya que dichos iones participan en numerosas reacciones bioquímicas. Esos valores se pueden calcular a partir de la ecuación 2.4 si se conoce la concentración del agua ($[H_2O]$) en el equilibrio. La masa de un litro de agua es 1000 g y la masa de 1 mol de agua es 18 g. Entonces, el agua pura tiene una concentración aproximada de 55.5 M. Se disocia un porcentaje muy pequeño de moléculas de agua para formar $H^{\oplus}$ y $OH^{\ominus}$ cuando la reacción de ionización llega al equilibrio. Eso tendrá un efecto muy pequeño sobre la concentración final de moléculas de agua en el equilibrio. Se simplifican los cálculos si se supone que la concentración de agua en la ecuación 2.4 es 55.5 M. Al sustituir este valor y el de la constante de equilibrio se llega a

$$(1.8 \times 10^{-16}\ M)(55.5\ M) = 1.0 \times 10^{-14}\ M^2 = [H^{\oplus}][OH^{\ominus}] \tag{2.5}$$

El producto obtenido de multiplicar las concentraciones de protón y de ion hidróxido ($[H^{\oplus}][OH^{\ominus}]$) se llama **producto iónico del agua**. A esta constante se le representa por K_w, la constante de producto iónico del agua. A 25°C, el valor de K_w es

$$K_w = [H^{\oplus}][OH^{\ominus}] = 1.0 \times 10^{-14}\ M^2 \tag{2.6}$$

Es coincidencia afortunada que este producto es un número entero, y no alguna fracción molesta, porque simplifica mucho los cálculos de concentraciones iónicas. El agua pura es eléctricamente neutra y su ionización produce cantidades iguales de protones y de iones hidróxido ($[H^{\oplus}] = [OH^{\ominus}]$). En el caso del agua pura, se puede escribir entonces la ecuación 2.6 como sigue:

$$K_w = [H^{\oplus}]^2 = 1.0 \times 10^{-14}\ M^2 \tag{2.7}$$

Se extrae la raíz cuadrada de los términos en la ecuación 2.7 y se obtiene

$$[H^{\oplus}] = 1.0 \times 10^{-7}\ M \tag{2.8}$$

Ya que $[H^{\oplus}] = [OH^{\ominus}]$, la ionización de agua pura produce 10^{-7} M de $H^{\oplus}$ y 10^{-7} M de $OH^{\ominus}$. Se dice que el agua pura y las soluciones acuosas que contienen concentraciones iguales de $H^{\oplus}$ y de $OH^{\ominus}$ son neutras. Cuando se disuelve un ácido en agua aumenta la $[H^{\oplus}]$ y se dice que la solución es ácida. Nótese que cuando un ácido se disuelve en agua aumenta la concentración de protones, mientras disminuye la concentración de iones hidróxido. Eso se debe a que no varía la constante del producto iónico del agua (K_w) (es decir, es constante), y el producto de las concentraciones de $H^{\oplus}$ por $OH^{\ominus}$ siempre será $1.0 \times 10^{-14}\ M^2$ (ecuación 2.5). Si se disuelve una base en agua disminuye $[H^{\oplus}]$ y se incrementa $[OH^{\ominus}]$ por encima de 1×10^{-7} M; se produce una solución básica o alcalina.

2.8 La escala de pH

Existen varios procesos bioquímicos —como el transporte de oxígeno en la sangre, la catálisis de reacciones con enzimas y la generación de energía metabólica durante la respiración o la fotosíntesis— que están muy influidos por la concentración de protones. Aunque la concentración de $H^{\oplus}$ (o $H_3O^{\oplus}$) en las células es pequeña en relación con la concentración del agua, el intervalo de $[H^{\oplus}]$ en soluciones acuosas es enorme,

TABLA 2.3 Relación de $[H^{\oplus}]$ y $[OH^{\ominus}]$ con el pH

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

por lo que conviene usar una cantidad logarítmica llamada pH como medida de la concentración de $H^{\oplus}$. El **pH** se define como el logaritmo negativo de la concentración de $H^{\oplus}$:

$$\text{pH} = -\log[H^{\oplus}] = \log\frac{1}{[H^{\oplus}]} \qquad \textbf{(2.9)}$$

En el agua pura, $[H^{\oplus}] = [OH^{\ominus}] = 1.0 \times 10^{-7}$ M (ecuación 2.8). Se dice que el agua pura es "neutra" con respecto a la carga iónica total ya que la concentración de los iones hidrógeno con carga positiva y la de los iones hidróxido con carga negativa es igual. Las soluciones neutras tienen un valor de pH igual a 7.0 porque el valor negativo del $\log(10^{-7})$ es 7.0. Las soluciones ácidas tienen un exceso de $H^{\oplus}$ debido a la presencia de soluto disuelto que suministra iones $H^{\oplus}$. Por ejemplo, en una solución de HCl 0.01 M la concentración de $H^{\oplus}$ es 0.01 M (10^{-2} M) porque el HCl se disocia por completo en $H^{\oplus}$ y en $Cl^{\ominus}$. El pH de esa solución es $-\log(10^{-2}) = 2.0$. Así, mientras mayor es la concentración de $H^{\oplus}$, el pH de la solución es menor. Como la escala de pH es logarítmica, un cambio de una unidad de pH corresponde a un cambio de 10 veces en la concentración de $H^{\oplus}$.

También las soluciones acuosas pueden contener menos iones $H^{\oplus}$ que el agua pura. Por ejemplo, en una solución de NaOH 0.01 M la concentración de $OH^{\ominus}$ es 0.01 M (10^{-2} M) porque el NaOH, como el HCl, se disocia 100% en el agua. Los iones $H^{\oplus}$ derivados de la ionización del agua se combinarán con los iones hidróxido del NaOH y volverán a formar moléculas de agua. Esto afecta el equilibrio de la ionización del agua (reacción 2.3). La solución que resulta es muy básica por la baja concentración de protones. Se puede determinar el pH real a partir del producto iónico del agua, K_w (reacción 2.6) sustituyendo la concentración de iones hidróxido. Ya que el producto de las concentraciones de $OH^{\ominus}$ por $H^{\oplus}$ es 10^{-14} M, entonces la concentración de $H^{\oplus}$ en una solución de $OH^{\ominus}$ igual a 10^{-2} M es 10^{-12} M. El pH de la solución es 12. La tabla 2.3 muestra esta relación entre el pH y las concentraciones de $H^{\oplus}$ y $OH^{\ominus}$.

RECUADRO 2.1 La pequeña "p" en pH.

Søren Peter Lauritz Sørensen usó por primera vez el término pH cuando era director de los Laboratorios Carlsberg en Dinamarca. Sørensen nunca mencionó qué significaba la pequeña "p" (la "H" es obviamente hidrógeno). Muchos días después algunos de los científicos que escribieron libros de texto comenzaron a asociar la pequeña "p" con las palabras "poder" o "potencial". Esta asociación, según se ha averiguado, se basa en una conexión muy tenue en algunos de los primeros trabajos de Sørensen. Una investigación reciente de registros históricos por parte de Jens G. Nøby parece indicar que la "p" pequeña fue una elección arbitraria, basada en el uso de *p* y *q* por parte de Sørensen, para indicar variables desconocidas, en forma muy parecida a como usamos hoy *x* y *y*.

Sin importar su origen histórico, es importante recordar que el símbolo pH representa hoy el logaritmo decimal negativo de la concentración de iones hidrógeno.

◀ Søren Peter Lauritz Sørensen (1868–1939)

Las soluciones básicas tienen valores de pH mayores que 7.0 y las soluciones ácidas tienen valores de pH menores que 7.0. La figura 2.15 ilustra los valores de pH de diversas soluciones. Se toman mediciones exactas de valores de pH en forma rutinaria usando un medidor de pH, instrumento que tiene un electrodo de vidrio selectivamente permeable, sensible a la $[H^{\oplus}]$. A veces la medición del pH facilita el diagnóstico de las enfermedades. El valor normal de pH en la sangre humana es 7.4, que con frecuencia se llama pH fisiológico. La sangre de pacientes que padecen ciertas enfermedades, como diabetes, puede tener menor pH, condición que se llama acidosis. El estado en el que el pH de la sangre es mayor que 7.4 se llama alcalosis y puede deberse a vómitos persistentes y prolongados (pérdida de ácido clorhídrico del estómago) o a hiperventilación (excesiva pérdida de ácido carbónico en forma de dióxido de carbono).

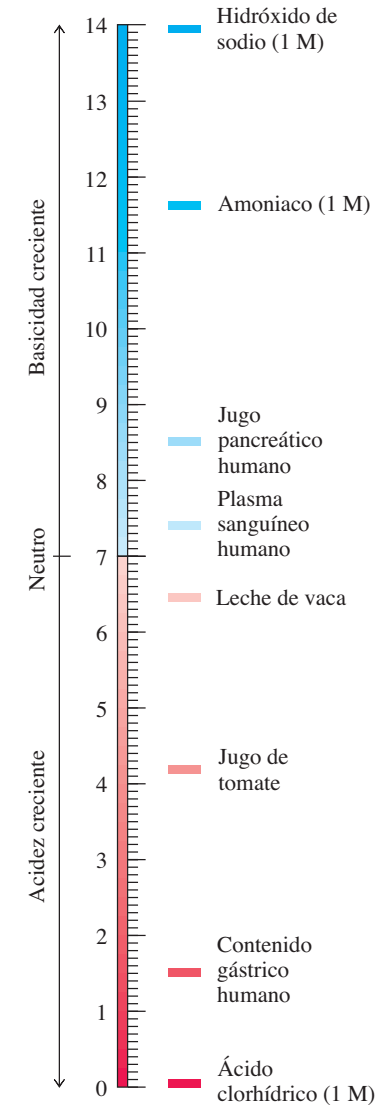


Figura 2.15 ▲
Valores de pH para diversos líquidos a 25°C. Los valores menores corresponden a líquidos ácidos; los valores mayores corresponden a líquidos básicos.

2.9 Constantes de disociación de ácidos débiles

Los ácidos y bases que se disocian por completo en agua, como el ácido clorhídrico y el hidróxido de sodio, se llaman ácidos fuertes y bases fuertes. Hay muchos otros ácidos y bases, como por ejemplo los aminoácidos que forman las proteínas y las purinas y pirimidinas del ADN y ARN, que no se disocian por completo en el agua. A dichas sustancias se les conoce como ácidos débiles y bases débiles.

Para comprender la relación entre ácidos y bases conviene observar la disociación de HCl en agua. Recuérdese, de la sección 2.7, que un ácido se definió como una molécula que puede donar un protón, y una base como un aceptador de protones. Los ácidos y las bases siempre existen en pares porque por cada donador de protón debe haber un aceptador de protón. Ambos lados de la reacción de disociación deben contener un ácido y una base. Así, la reacción del equilibrio de la disociación completa del HCl es

$$\underset{\text{ácido}}{HCl} + \underset{\text{base}}{H_2O} \rightleftharpoons \underset{\text{base}}{Cl^{\ominus}} + \underset{\text{ácido}}{H_3O^{\oplus}} \qquad \textbf{(2.10)}$$

El HCl es un ácido porque puede donar un protón. En este caso el aceptador de protón es el agua, que es la base en esta reacción de equilibrio. En el otro lado del equilibrio están los iones $Cl^{\ominus}$ y el hidronio $H_3O^{\oplus}$. El ion cloruro es la base que corresponde al HCl después que cede su protón. Al $Cl^{\ominus}$ se le llama la **base conjugada** del HCl, lo que indica que es una base, es decir, que puede aceptar un protón, y es parte de un par ácido-base (es decir, HCl/Cl^{-}). De igual modo, el $H_3O^{\oplus}$ es el ácido en el lado derecho del equilibrio porque puede donar un protón. $H_3O^{\oplus}$ es el **ácido conjugado** del H_2O. Toda base tiene un ácido conjugado correspondiente, y todo ácido tiene una base conjugada correspondiente. Así, el HCl es el ácido conjugado del $Cl^{\ominus}$, y el H_2O es la base conjugada del $H_3O^{\oplus}$. (Nótese que H_2O es el ácido conjugado del $OH^{\ominus}$ cuando se hace referencia al par ácido-base $H_2O/OH^{\ominus}$).

En la mayor parte de los casos, en este libro, las reacciones se simplifican como la 2.10, sin tener en cuenta la contribución del agua, y representando al ion hidronio como un simple protón.

$$HCl \rightleftharpoons H^{\oplus} + Cl^{\ominus} \qquad \textbf{(2.11)}$$

Se trata de una convención normal en bioquímica pero, superficialmente, parece violar la regla que ambos lados de la reacción de equilibrio deben contener un donador de protón y un aceptador de protón. Los alumnos deben tener en mente que en esas reacciones están implícitas las contribuciones de moléculas de agua como aceptadores de protones, y de iones hidronio como los verdaderos donadores de protones. Casi en todos los casos se puede pasar por alto, con seguridad, la contribución del agua. Es el mismo principio que se aplica a la reacción de disociación del agua (sección 2.7), que fue simplificada al prescindir de la contribución de una de las moléculas de agua.

La razón por la que el HCl es un ácido tan fuerte es porque el equilibrio, en la reacción 2.11, está desplazado tan hacia la derecha que el HCl se disocia por completo en el

agua. En otras palabras, el HCl tiene una fuerte tendencia a donar un protón cuando se disuelve en agua. Esto también quiere decir que la base conjugada, $Cl^{\ominus}$, es muy débil porque casi nunca aceptará un protón. Cuando se trata de ácidos fuertes, los componentes del par ácido-base se llaman ácido y su base conjugada, aunque sería técnicamente correcto llamarlos ácido conjugado y base muy débil. Es fácil identificar que el HCl es un ácido fuerte, pero cuando se trata de ácidos débiles o bases débiles con frecuencia es difícil decidir si determinado par de ácido-base debe llamarse ácido débil y base conjugada o base débil y ácido conjugado.

El ácido acético es el ácido débil presente en el vinagre. La reacción de equilibrio de ionización del ácido acético es

$$\underset{\substack{\text{Ácido acético}\\(\text{ácido débil})}}{CH_3COOH} \overset{K_a}{\rightleftharpoons} H^{\oplus} + \underset{\substack{\text{Anión acetato}\\(\text{base conjugada})}}{CH_3COO^{\ominus}} \qquad \textbf{(2.12)}$$

Nótese que no se incluye la contribución de las moléculas de agua para simplificar la reacción. Según la reacción 2.11 se puede ver que el ion acetato es la base conjugada del ácido acético. (También se puede decir que el ácido acético es el ácido conjugado del ion acetato).

La constante de equilibrio para la disociación de un protón de un ácido en agua se llama **constante de disociación del ácido, K_a**. Cuando la reacción llega al equilibrio, lo que sucede con mucha rapidez, la constante de disociación del ácido es igual a la concentración de los productos dividida entre la concentración de los reactivos. Para la reacción 2.12, la constante de disociación del ácido es

$$K_a = \frac{[H^{\oplus}][CH_3COO^{\ominus}]}{[CH_3COOH]} \qquad \textbf{(2.13)}$$

La K_a del ácido acético a 25°C es de 1.76×10^{-5} M. Como los valores numéricos de K_a son pequeños e incómodos en los cálculos, se aconseja manejarlos en escala logarítmica. Por analogía con el pH, se define al $\mathbf{pK_a}$ como

$$pK_a = -\log K_a = \log\frac{1}{K_a} \qquad \textbf{(2.14)}$$

Un valor de pH es una medida de la acidez de una solución y un valor de pK_a es una medida de la fuerza ácida de determinado compuesto. El pK_a del ácido acético es de 4.8.

Cuando se habla de bases se necesita tener en cuenta sus formas protonadas para aplicar la ecuación 2.13. Estos ácidos conjugados son muy débiles. Para simplificar los cálculos y hacer comparaciones fáciles, se mide la constante de equilibrio (K_a) de la disociación de un protón del ácido conjugado de una base débil. Por ejemplo, el ion amonio ($NH_4^{\oplus}$) se puede disociar y formar la base amoniaco (NH_3) y $H^{\oplus}$.

$$NH_4^{\oplus} \rightleftharpoons NH_3 + H^{\oplus} \qquad \textbf{(2.15)}$$

La constante de disociación de ácido (K_a) para este equilibrio es una medida de la fuerza de la base (amoniaco, NH_3) en solución acuosa. Los valores de K_a de varias sustancias comunes se muestran en la tabla 2.4.

En la ecuación 2.13 se ve que la K_a del ácido acético se relaciona con la concentración de $H^{\oplus}$ y con la relación de las concentraciones del ion acetato y el ácido acético no disociado. Si se representa con $HA^{\ominus}$ al ácido conjugado y con $A^{\oplus}$ a la base conjugada, entonces al sacar el logaritmo de esas ecuaciones se obtiene la ecuación general para cualquier par de ácido-base:

$$HA \rightleftharpoons H^{\oplus} + A^{\ominus} \qquad \log K_a = \log\frac{[H^{\oplus}][A^{\ominus}]}{[HA]} \qquad \textbf{(2.16)}$$

TABLA 2.4 Valores de constantes de disociación y de pK_a de ácidos débiles en soluciones acuosas a 25°C

Ácido	K_a(M)	pK_a
HCOOH (Ácido fórmico)	1.77×10^{-4}	3.8
CH_3COOH (Ácido acético)	1.76×10^{-5}	4.8
$CH_3CHOHCOOH$ (Ácido láctico)	1.37×10^{-4}	3.9
H_3PO_4 (Ácido fosfórico)	7.52×10^{-3}	2.2
$H_2PO_4^{\ominus}$ (Ion fosfato de dihidrógeno)	6.23×10^{-8}	7.2
$HPO_4^{2\ominus}$ (Ion fosfato de monohidrógeno)	2.20×10^{-13}	12.7
H_2CO_3 (Ácido carbónico)	4.30×10^{-7}	6.4
$HCO_3^{\ominus}$ (Ion bicarbonato)	5.61×10^{-11}	10.2
$NH_4^{\oplus}$ (Ion amonio)	5.62×10^{-10}	9.2
$CH_3NH_3^{\oplus}$ (Ion metilamonio)	2.70×10^{-11}	10.7

Como $\log(xy) = \log x + \log y$, la ecuación 2.16 se puede reformular como sigue:

$$\log K_a = \log[H^{\oplus}] + \log\frac{[A^{\ominus}]}{[HA]} \qquad \textbf{(2.17)}$$

Esta ecuación se reordena como sigue:

$$-\log[H^{\oplus}] = -\log K_a + \log\frac{[A^{\ominus}]}{[HA]} \qquad \textbf{(2.18)}$$

Ya se definieron los logaritmos negativos de la ecuación 2.18 como pH y pK_a, respectivamente (ecuaciones 2.9 y 2.14). Entonces

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log\frac{[A^{\ominus}]}{[HA]} \qquad \textbf{(2.19)}$$

o sea

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log\frac{[\text{Aceptador de protones}]}{[\text{Donador de protones}]} \qquad \textbf{(2.20)}$$

La ecuación 2.20 es una versión de la **ecuación de Henderson-Hasselbalch,** que define al pH de una solución en función del pK_a del ácido débil en el par ácido-base, y del logaritmo de la relación de las concentraciones de la especie disociada (base conjugada) entre la especie protonada (ácido débil). Nótese que mientras mayor sea la concentración del aceptador de protón (base conjugada) en relación con la del donador de protón (ácido débil) el pH será mayor. Ello coincide con la intuición, ya que la concentración de $A^{\ominus}$ es idéntica a la concentración de $H^{\oplus}$ en reacciones de disociación sencilla. Si se disocia más HA, la concentración de $A^{\ominus}$ será mayor y también la concentración de $H^{\oplus}$. Cuando las concentraciones de un ácido débil y de su base conjugada son exactamente iguales, el pH de la solución es igual al pK_a del ácido (ya que la relación de las concentraciones es igual a 1.0, y el logaritmo de 1.0 es igual a cero).

La ecuación de Henderson-Hasselbalch se usa para calcular el pH final de una solución de ácido débil, una vez que la reacción de disociación llega al equilibrio, como se ve en el cálculo de ejemplo 2.1 para el ácido acético. Esos cálculos se complican más

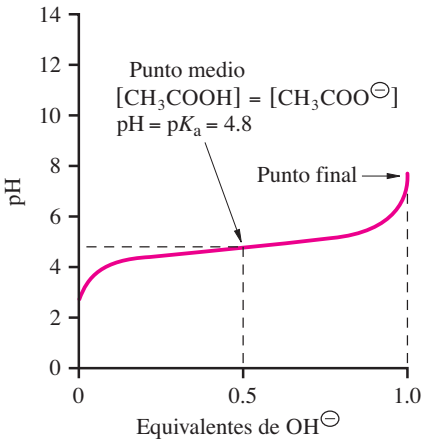


Figura 2.16 ▲
Titulación de ácido acético (CH_3COH) con una base ($OH^{\ominus}$) acuosa. Hay un punto de inflexión (punto de pendiente mínima) en el punto medio de la titulación cuando se agrega 0.5 equivalente de la base a la solución de ácido acético. Es el punto en el que $[CH_3COOH] = [CH_3COO^{\ominus}]$ y el $pH = pK_a$. El pK_a del ácido acético es, entonces, 4.8. En el punto final, todas las moléculas de ácido acético se han titulado y convertido en la base conjugada acetato.

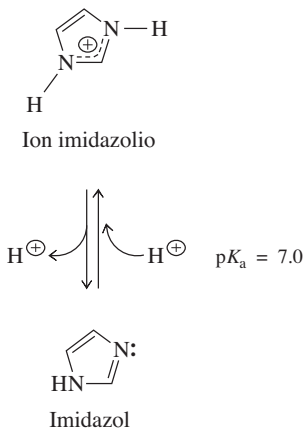


Figura 2.17 ▲
Titulación del ion imidazolio.

que los que implican ácidos fuertes, como el HCl. Como se dijo en la sección 2.8, el pH de una solución de HCl se determina con facilidad a partir de la cantidad de HCl que haya, ya que la concentración final de $H^{\oplus}$ es igual a la concentración inicial de HCl cuando se prepara la solución. En contraste, los ácidos débiles sólo se disocian parcialmente en agua y cobra sentido entonces que el pH depende de la constante de disociación del ácido. El pH disminuye (hay más $H^{\oplus}$) a medida que se agrega más ácido débil al agua, pero el aumento de $H^{\oplus}$ no es lineal respecto a la concentración de HA inicial. Eso se debe a que el numerador de la ecuación 2.16 es el *producto* de las concentraciones de $H^{\oplus}$ por $A^{\ominus}$.

La ecuación de Henderson-Hasselbalch se aplica también a otras combinaciones de ácido y base, y no sólo a aquellas donde intervienen ácidos débiles. Cuando se trata de una base débil, por ejemplo, el numerador y el denominador de la ecuación 2.20 se vuelven [base débil] y [ácido conjugado], respectivamente. Lo importante a recordar es que la ecuación se refiere a la concentración del aceptador de protón dividida entre la concentración del donador de protón.

Los valores de pK_a de los ácidos débiles se determinan por titulación. En la figura 2.16 se ve la curva de titulación del ácido acético. En este ejemplo se titula una solución de ácido acético agregando pequeñas alícuotas de una base fuerte de concentración conocida. Se mide el pH de la solución y se grafica en función de la cantidad de equivalentes molares de base fuerte agregados durante la titulación. Nótese que, como el ácido acético sólo tiene un grupo ionizable (su grupo carboxilo), sólo se necesita un equivalente de una base fuerte para titular por completo el ácido acético y transformarlo en su base conjugada, el anión acetato. Cuando se ha titulado el ácido con la mitad de un equivalente de base, la concentración del ácido acético no disociado es exactamente igual a la concentración del anión acetato. El pH que resulta es 4.8, y por consiguiente es el pK_a del ácido acético, determinado en forma experimental.

El trazo de una curva ideal de titulación es un buen ejercicio para reforzar la relación entre pH y el estado de ionización de un ácido débil. El lector puede aplicar la ecuación de Henderson-Hasselbalch para calcular el pH que resulta de agregar cantidades crecientes de una base fuerte, como NaOH, a un ácido débil, como el ion imidazolio ($pK_a = 7.0$). Al agregar la base el ion imidazolio se convierte en su base conjugada, imidazol (figura 2.17). Es fácil visualizar la forma de la curva de titulación si se calcula el pH cuando la relación de base conjugada entre ácido es 0.01, 0.1, 1, 10 y 100. El lector debiera calcular valores de pH a otras relaciones hasta quedar satisfecho de que la curva sea relativamente plana cerca del punto medio y más pendiente en los extremos.

Se pueden obtener curvas de titulación de forma similar para cada uno de los cinco ácidos monopróticos (ácidos que sólo tienen un grupo ionizable) de la tabla 2.4. Todos deberían tener la misma forma general que la de la figura 2.16, pero el punto de inflexión, que representa el punto medio de la titulación (cuando ya se tituló la mitad de un equivalente), caería más abajo en la escala de pH cuando el ácido fuera más fuerte (como el ácido fórmico o el ácido láctico) y sería mayor con un ácido más débil (como el ion amonio o el ion metilamonio).

Las curvas de titulación de ácidos débiles ilustran una segunda aplicación importante de la ecuación de Henderson-Hasselbalch. En este caso, el pH final es el resultado de mezclar el ácido débil (HA) y una base fuerte ($OH-$). La base se combina con los iones $H^{\oplus}$ para formar moléculas de agua (H_2O); ello reduce la concentración de $H^{\oplus}$ y eleva el pH. Al continuar con la titulación del ácido débil, se disocia para restaurar su equilibrio con $OH^{\ominus}$ y H_2O. El resultado neto es que la concentración final de $A^{\ominus}$ es mucho mayor, y la concentración de HA es mucho menor que las que se manejan en el caso sencillo en el que se determina el pH sólo por la disociación del ácido débil en agua (es decir, la solución de HA en H_2O).

El ácido fosfórico (H_3PO_4) es un ácido poliprótico. Contiene tres átomos distintos de hidrógeno que se pueden disociar y formar iones $H^{\oplus}$ y bases conjugadas correspondientes con una, dos o tres cargas negativas. La disociación del primer protón sucede con facilidad y se asocia con una constante de disociación ácida grande de 7.53×10^{-3} M y un pK_a de 2.2 en solución acuosa. Las disociaciones del segundo y tercer protón son progresivamente menos fáciles porque deben disociarse de una molécula que ya tiene carga negativa.

EJEMPLO DE CÁLCULO 2.1 Cálculo del pH de soluciones de ácido débil

P: ¿Cuál es el pH de una solución de ácido acético 0.1 M?

R: La constante de disociación del ácido acético es 1.76×10^{-5} M. El ácido acético se disocia en agua para formar acetato y $H^{\oplus}$. Necesitamos determinar la $[H^{\oplus}]$ cuando la reacción llega al equilibrio.

Representemos la concentración final de $H^{\oplus}$ con la cantidad desconocida x. En el equilibrio, la concentración del ion acetato también será x, y la concentración final del ácido acético será $[0.1\ M - x]$. Entonces

$$1.76 \times 10^{-5} = \frac{[H^{\oplus}][CH_3COO^{\ominus}]}{[CH_3COOH]} = \frac{x^2}{(0.1 - x)}$$

Se reordena como sigue:

$$1.76 \times 10^{-6} - 1.76 \times 10^{-5}x = x^2$$

$$x^2 + 1.76 \times 10^{-5}\,x - 1.76 \times 10^{-6} = 0$$

Esta ecuación es una ecuación cuadrática típica de la forma $ax^2 + bx + c$, donde $a = 1$, $b = 1.76 \times 10^{-5}$ y $c = -1.76 \times 10^{-6}$. Despejaremos a x con la fórmula acostumbrada:

$$x = \frac{-b \pm \sqrt{(b^2 - 4ac)}}{2a}$$

$$= \frac{-1.76 \times 10^{-5} \pm \sqrt{((1.76 \times 10^{-5})^2 - 4(1.76 \times 10^{-6}))}}{2}$$

$x = 0.00132$ o -0.00132 (se rechaza el resultado negativo)

La concentración de iones hidrógeno es 0.00132 M, y el pH es

$$pH = -\log[H^{\oplus}] = -\log(0.00132) = -(-2.88) = 2.9$$

Observe que la aportación de los iones hidrógeno producidos por la disociación del agua (10^{-7}) es varios órdenes de magnitud menor que la de los iones hidrógeno producidos por el ácido acético. Se acostumbra ignorar la ionización del agua en la mayor parte de los cálculos, siempre que la concentración inicial del ácido débil sea mayor que 0.001 M.

La cantidad de ácido acético que se disocia para formar $H^{\oplus}$ y $CH_3COO^{\ominus}$ es 0.0013 M cuando la concentración inicial es 0.1 M. Ello significa que sólo se disocia el 1.3% de las moléculas de ácido acético y que la concentración final de ácido acético ($[CH_3COOH]$) es 98.7% de la concentración inicial. En general, el porcentaje de disociación de soluciones diluidas de ácidos débiles es menor que 10% y es una aproximación razonable suponer que la concentración final de la forma ácida es igual que su concentración inicial. Esta aproximación tiene muy poco efecto sobre el pH calculado y encierra la ventaja de evitar ecuaciones cuadráticas.

Suponiendo que la concentración del CH_3COOH en el equilibrio es 0.1 M, y que la concentración de $H^{\oplus}$ es x,

$$K_a = 1.76 \times 10^{-5} = \frac{x^2}{0.1} \qquad x = 1.33 \times 10^{-3}$$

$$pH = -\log(1.33 \times 10^{-3}) = 2.88 = 2.9$$

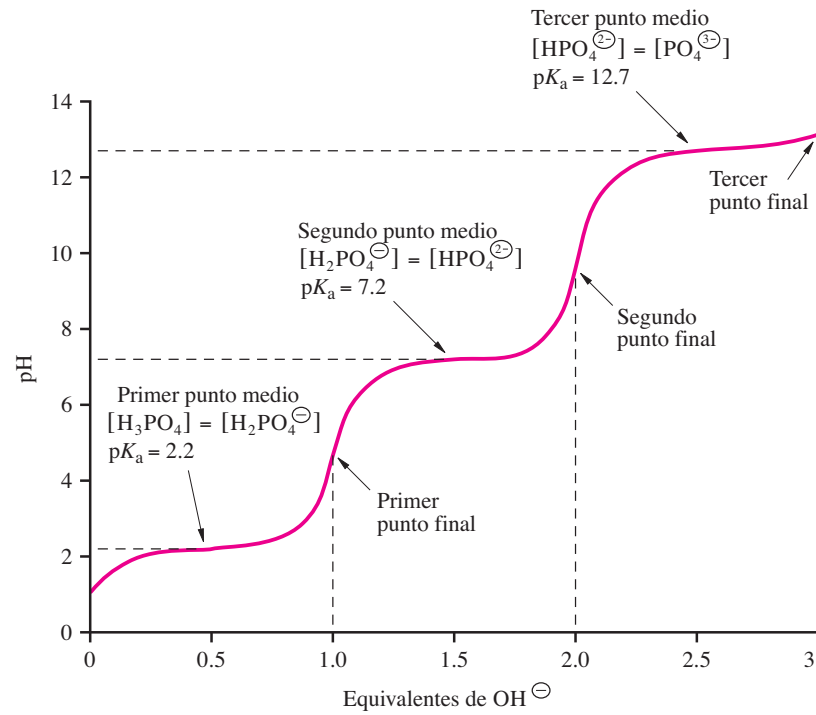
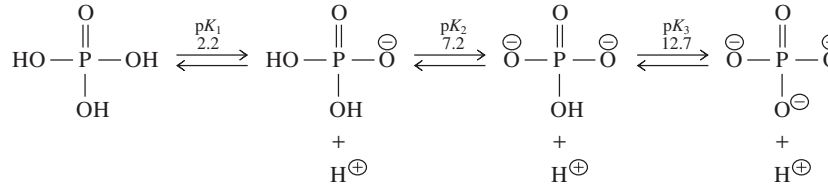


Figura 2.18 ▶
Curva de titulación del ácido fosfórico (H_3PO_4). Los tres puntos de inflexión (a 0.5, 1.5 y 2.5 equivalentes de la base fuerte agregada) corresponden a los tres valores de pK_a del ácido fosfórico (2.2, 7.2 y 12.7).

El ácido fosfórico requiere tres equivalentes de base fuerte para su titulación completa y en su curva de titulación (figura 2.18) son evidentes tres valores de pK_a. Estos tres valores de pK_a reflejan las tres constantes de equilibrio y por tanto la existencia de cuatro especies iónicas posibles (ácidos y bases conjugados) de fosfato inorgánico. Al pH fisiológico (7.4), las especies predominantes de fosfato inorgánico son $H_2PO_4^-$ y HPO_4^{2-}. A pH 7.2, estas dos especies existen en concentraciones iguales. Las concentraciones de H_3PO_4 y de PO_4^{3-} son tan bajas cuando el pH es 7.4 que se pueden pasar por alto. Es el caso general de una especie secundaria, cuando el pH está alejado más de dos unidades de su pK_a.



(2.21)

Muchos ácidos y bases de importancia biológica, como los aminoácidos que se describen en el capítulo 3, tienen dos o más grupos ionizables. La cantidad de valores de pK_a para esas sustancias es igual a la cantidad de sus grupos ionizables, que se puede determinar en forma experimental por titulación.

2.10 Soluciones amortiguadoras para resistir cambios de pH

Si el pH de una solución permanece casi constante cuando se agregan pequeñas cantidades de ácido o base fuerte, se dice que la solución está *regulada* o *amortiguada*. La capacidad de una solución para resistir cambios de pH se llama capacidad de amortiguación.

Al repasar las curvas de titulación del ácido acético (figura 2.16) y del ácido fosfórico (figura 2.18) se ve que la regulación más efectiva, representada por la región de pendiente mínima en la curva, se presenta cuando las concentraciones de un ácido débil y su base conjugada son iguales; en otras palabras, cuando el pH es igual al pK_a. El intervalo efectivo de amortiguación por una mezcla de ácido débil y su base conjugada se suele considerar desde una unidad de pH abajo hasta una unidad de pH arriba del pK_a.

La mayor parte de los experimentos bioquímicos *in vitro* con moléculas purificadas, extractos celulares o células intactas se hace en presencia de un amortiguador (también se le llama *buffer*) adecuado que asegure un pH estable. Para preparar soluciones amortiguadoras se utilizan varios compuestos sintéticos, con una diversidad de valores de pK_a. Por ejemplo, se pueden usar mezclas de ácido acético y acetato de sodio ($pK_a = 4.8$) para el intervalo de pH de 4 a 6 y mezclas de KH_2PO_4 y K_2HPO_4 ($pK_a = 7.2$) para el intervalo de 6 a 8. Con frecuencia se usa el aminoácido glicina ($pK_a = 9.8$) en el intervalo de 9 a 11. En el ejemplo de cálculo 2.2 se ilustra una forma de preparar una solución amortiguadora.

Un ejemplo excelente de la capacidad amortiguadora se encuentra en el plasma sanguíneo de los mamíferos, que tiene un pH notablemente constante. A continuación se revisan los resultados de un experimento donde se compara la adición de una alícuota de ácido fuerte a un volumen de plasma sanguíneo con una adición similar de ácido fuerte a suero fisiológico (NaCl 0.15 M) o agua. Cuando se agrega un mililitro de HCl (ácido clorhídrico) 10 M a 1 litro de suero fisiológico o de agua cuyo pH inicial es de 7.0 el pH baja a 2.0 (en otras palabras, la $[H^{\oplus}]$ del HCl se diluye a 10^{-2} M). Sin embargo, cuando se agrega 1 mililitro de HCl 10 M a 1 litro de plasma sanguíneo humano a pH de 7.4 el pH sólo baja a 7.2 —es una impresionante prueba de la eficacia de la regulación fisiológica.

EJEMPLO DE CÁLCULO 2.2 Preparación de una solución amortiguadora

P: El ácido acético tiene $pK_a = 4.8$. ¿Cuántos mililitros de ácido acético 0.1 M y de acetato de sodio 0.1 M se requieren para preparar 1 litro de una solución amortiguadora cuyo pH sea de 5.8?

A: Se sustituyen los valores de pK_a y del pH que se desea en la ecuación de Henderson-Hasselbalch (ecuación 2.17):

$$5.8 = 4.8 + \log\frac{[\text{Acetato}]}{[\text{Ácido acético}]}$$

Se despeja la relación de acetato entre ácido acético:

$$\log\frac{[\text{Acetato}]}{[\text{Ácido acético}]} = 5.8 - 4.8 = 1.0$$

$$[\text{Acetato}] = 10\,[\text{Ácido acético}]$$

Por cada volumen de ácido acético se deben agregar 10 volúmenes de acetato (haciendo un total de 11 volúmenes de las dos especies iónicas). Se multiplica la proporción de cada componente por el volumen que se desea:

$$\text{Ácido acético necesario:} \quad \frac{1}{11} \times 1000\text{ ml} = 91\text{ ml}$$

$$\text{Acetato necesario:} \quad \frac{10}{11} \times 1000\text{ ml} = 909\text{ ml}$$

Obsérvese que cuando la relación de [base conjugada] entre [ácido conjugado] es 10:1, el pH está exactamente una unidad arriba del pK_a. Si la relación hubiera sido de 1:10, el pH estaría una unidad más abajo del pK_a.

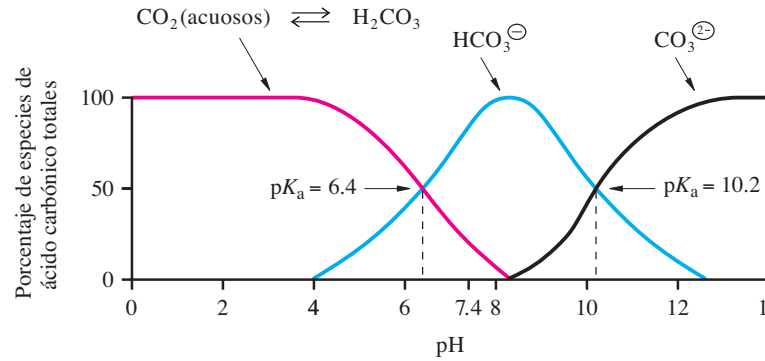


Figura 2.19 ▶
Porcentajes de ácido carbónico y sus bases conjugadas en función del pH. En una solución acuosa a pH 7.4 (el pH de la sangre), las concentraciones de ácido carbónico (H_2CO_3) y de bicarbonato ($HCO_3^{\ominus}$) son apreciables, pero la concentración de carbonato (CO_3^{2-}) es despreciable.

El pH de la sangre se regula principalmente por el sistema amortiguador de dióxido de carbono-ácido carbónico-bicarbonato. En la figura 2.19 se ve una gráfica de los porcentajes de ácido carbónico (H_2CO_3) y de cada una de sus bases conjugadas en función del pH. Nótese que las formas principales del ácido carbónico a pH 7.4 son ácido carbónico y el anión bicarbonato ($HCO_3^{\ominus}$).

La capacidad amortiguadora de la sangre depende de los equilibrios entre el dióxido de carbono gaseoso (presente en los alveolos pulmonares), el dióxido de carbono acuoso (se produce en los tejidos que respiran y se disuelve en la sangre), el ácido carbónico y el bicarbonato. Como se ve en la figura 2.19, el equilibrio entre bicarbonato y carbonato (CO_3^{2-}) no aporta mucho a la capacidad amortiguadora de la sangre porque el pK_a del bicarbonato es de 10.2, demasiado alejado del pH fisiológico para ejercer algún efecto sobre la amortiguación de la sangre.

El primero de los tres equilibrios importantes en el sistema amortiguador de dióxido de carbono-ácido carbónico-bicarbonato es la disociación del ácido carbónico a bicarbonato:

$$H_2CO_3 \rightleftharpoons H^{\oplus} + HCO_3^{\ominus} \qquad \textbf{(2.22)}$$

Este equilibrio se ve influido por un segundo equilibrio, en el que el dióxido de carbono disuelto, CO_2(acuoso), está en equilibrio con su forma hidratada, el ácido carbónico:

$$CO_2(\text{acuoso}) + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \qquad \textbf{(2.23)}$$

Estas dos reacciones se pueden combinar en un solo equilibrio de reacción donde el ácido se representa como CO_2 disuelto en agua:

$$CO_2(\text{acuoso}) + H_2O \rightleftharpoons H^{\oplus} + HCO_3^{\ominus} \qquad \textbf{(2.24)}$$

El pK_a del ácido es de 6.4.

Por último, el CO_2(gaseoso) está en equilibrio con el CO_2(acuoso):

$$CO_2(\text{gaseoso}) \rightleftharpoons CO_2(\text{acuoso}) \qquad \textbf{(2.25)}$$

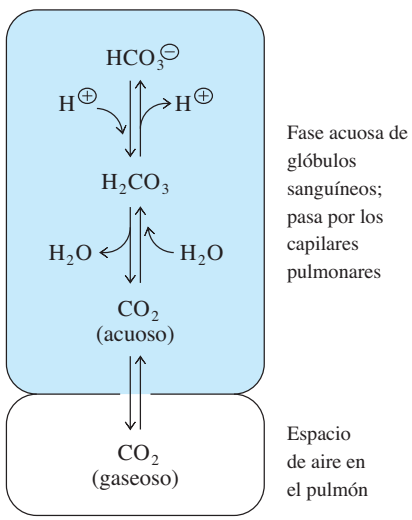


Figura 2.20 ▲
Regulación del pH en la sangre de los mamíferos. El pH de la sangre está controlado por la relación de [$HCO_3^{\ominus}$] entre pCO_2, en los espacios aéreos de los pulmones. Cuando el pH de la sangre disminuye por exceso de HM, pCO_2 aumenta en los pulmones y restaura el equilibrio. Cuando aumenta la concentración de $HCO_3^{\ominus}$ porque aumenta el pH de la sangre, el CO_2 (gaseoso) se disuelve en la sangre y se restaura de nuevo el equilibrio.

La regulación del pH en la sangre que producen estos tres equilibrios se ve en forma esquemática en la figura 2.20. Cuando el pH de la sangre baja debido a un proceso metabólico que produce exceso de $H^{\oplus}$, la concentración de H_2CO_3 aumenta en forma momentánea, pero el H_2CO_3 pierde rápidamente agua para formar CO_2 (acuoso) disuelto, que entra a la fase gaseosa en los pulmones y se espira como CO_2 (gaseoso). Un aumento en la presión parcial de CO_2 (pCO_2) en el aire espirado por los pulmones compensa así el aumento de iones hidrógeno. Al revés, cuando aumenta el pH de la sangre, aumenta en forma transitoria la concentración de HCO3$^{\ominus}$ en forma momentánea, pero el pH se recupera con celeridad cuando la frecuencia respiratoria cambia y el CO_2(ga-

seoso) en los pulmones se convierte en CO_2(acuoso) y después en H_2CO_3 en los capilares pulmonares. De nuevo, el equilibrio del sistema amortiguador sanguíneo se restaura con rapidez al cambiar la presión parcial del CO_2 en los pulmones.

Dentro de las células, tanto las proteínas como los fosfatos inorgánicos contribuyen al amortiguamiento intracelular. La hemoglobina es el amortiguador más fuerte en la sangre, aparte del amortiguador de dióxido de carbono-ácido carbónico-carbonato. Como se dijo antes, las especies principales de fosfato inorgánico presentes a pH fisiológico son el $H_2PO_4^{\ominus}$ y el $HPO_4^{2\ominus}$, que reflejan el valor del segundo pK_a (pK_2) del ácido fosfórico, 7.2.

Resumen

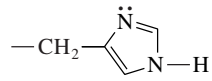
1. Debido a la distribución heterogénea de las cargas en los enlaces O—H y a su disposición angulada, la molécula de agua tiene un dipolo permanente.
2. Las moléculas de agua pueden formar puentes de hidrógeno entre sí. Los puentes de hidrógeno determinan que el calor específico y el calor de vaporización del agua sean altos.
3. Debido a que es polar, el agua puede disolver electrólitos cristalinos. Las moléculas de agua forman una esfera de solvatación en torno a cada ion disuelto. Las moléculas orgánicas pueden ser solubles en agua si contienen grupos funcionales iónicos o polares que puedan formar puentes de hidrógeno con moléculas de agua.
4. El efecto hidrofóbico es la exclusión de sustancias no polares por parte de moléculas de agua. Los detergentes, que contienen partes hidrofóbicas e hidrofílicas, forman micelas cuando están suspendidos en agua; estas micelas pueden aprisionar sustancias insolubles en un interior hidrofóbico. Los caótropos aumentan la solubilidad de compuestos no polares en agua.
5. Las principales interacciones no covalentes que determinan la estructura y la función de las biomoléculas son las interacciones electrostáticas y las hidrofóbicas. Las interacciones electrostáticas incluyen las interacciones carga-carga, los puentes de hidrógeno y las fuerzas de van der Waals.
6. Bajo condiciones celulares, las macromoléculas no se hidrolizan espontáneamente, a pesar de la presencia de altas concentraciones de agua. Enzimas específicas catalizan su hidrólisis y otras enzimas catalizan su síntesis utilizando energía.
7. A 25°C, el valor de $[H^{\oplus}][OH^{\ominus}]$ es 1.0×10^{-14} M^2, una constante que se representa por K_w (la constante de producto iónico para el agua). El agua pura se ioniza produciendo 10^{-7} M de $H^{\oplus}$ y 10^{-7} M de $OH^{\ominus}$.
8. La acidez o basicidad de una solución acuosa depende de la concentración de $H^{\oplus}$, y se describe con un valor de pH.
9. La fuerza de un ácido débil se indica por el valor del pK_a. La ecuación de Henderson-Hasselbalch define el pH de una solución de ácido débil en términos del pK_a y de las concentraciones del ácido débil y de su base conjugada.
10. Las soluciones amortiguadoras resisten los cambios de pH. En la sangre humana el sistema amortiguador de dióxido de carbono-ácido carbónico-bicarbonato mantiene un pH constante de 7.4.

Problemas

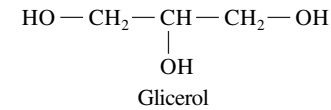
1. Las cadenas laterales de algunos aminoácidos poseen grupos funcionales que forman puentes de hidrógeno en soluciones acuosas con facilidad. Dibuje los puentes de hidrógeno que probablemente se formen entre el agua y las siguientes cadenas laterales de aminoácido:

   a) $—CH_2OH$

   b) $—CH_2C(O)NH_2$

   c) 

2. Indique si cada uno de los compuestos siguientes es polar, si es anfipático y si se disuelve fácilmente en el agua.

   a) 
   Glicerol

   b) $CH_3(CH_2)_{14}—CH_2—OPO_3^{2\ominus}$
   Fosfato de hexadecanilo

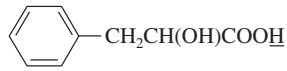
   c) $CH_3—(CH_2)_{10}—COO^{\ominus}$
   Laurato

   d) $H_3N^{\oplus}—CH_2—COO^{\ominus}$
   Glicina

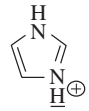
3. La lisis osmótica es un método benigno para romper y abrir células animales con el fin de liberar las proteínas intracelulares. En esta técnica las células se suspenden en una solución cuya concentración molar total de solutos es mucho menor que la que hay en el interior de las células. Explique por qué esta técnica haría estallar a las células.

4. Cada una de las moléculas siguientes se disuelve en soluciones amortiguadoras de: a) pH = 2 y b) pH = 11. Para cada molécula, indique la solución en la que predomine la especie cargada. (Suponga que las moléculas agregadas no cambian apreciablemente el pH de la solución).

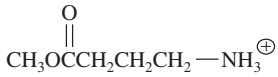
a) ácido fenilláctico, pK_a = 4



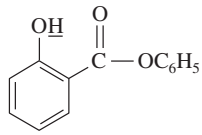
b) Imidazol, pK_a = 7



c) *O*-metil-γ-aminobutirato, pK_a = 9.5

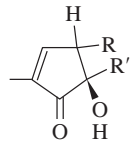


d) Salicilato de fenilo, pK_a = 9.6



5. Use la figura 2.15 para determinar la concentración iónica de $H^{\oplus}$ y $OH^{\ominus}$ en:
a) Jugo de tomate
b) plasma sanguíneo humano , y
c) amoniaco 1 M

6. Se puede mediar la interacción entre dos (o más) moléculas en solución mediante interacciones específicas de puente de hidrógeno. Los ésteres de forbol pueden ser promotores de tumor al unirse a ciertos aminoácidos que sean parte de la enzima proteína cinasa C (PKC, de *protein kinase C*). Trace los puentes de hidrógeno que cabe esperar se formen en el complejo entre el forbol, promotor de tumores, y la parte de glicina de la PKC, —$NHCH_2C(O)$—

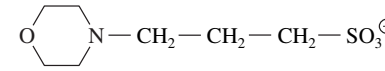


Forbol

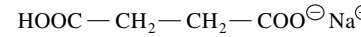
7. ¿Cuál es la concentración de una solución amortiguadora de ácido láctico (pK_a = 3.9) que contiene $CH_3CH(OH)COOH$ 0.25 M y $CH_3CH(OH)COO^{\ominus}$ 0.15 M? ¿Cuál es el pH de esta solución amortiguadora?

8. Se le indica a usted que prepare 100 ml de una solución amortiguadora de fosfato, pH = 7.2, mezclando 50 ml de la solución A (Na_2HPO_4 0.02 M) y 50 ml de solución B (NaH_2PO_4 0.02 M). Vea la tabla 2.4 para explicar por qué con este procedimiento se prepara bien ese amortiguador a pH y concentración deseados.

9. a) ¿Cuáles son los intervalos de amortiguamiento más efectivos del MOPS (de (3-(*N-morpholino)propanesulfonic acid*, ácido 3-(*N*-morfolino)propanosulfónico) y del SHS (de *sodium hydrogen succinato*, succinato de sodio e hidrógeno)?



MOPS

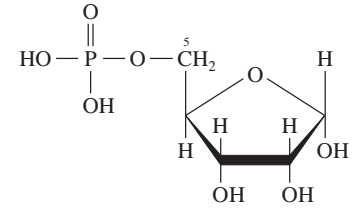


SHS

El átomo de nitrógeno del MOPS se puede protonar (pK_a = 7.2). El grupo carboxilo del SHS se puede ionizar (pK_a = 5.5). Calcule la relación de especies ácidas para cada amortiguador a pH = 6.5.

b) ¿Cuál amortiguador, MOPS o SHS, mantendría con más eficacia el pH si se agregara ácido a una solución con pH = 6.5? ¿Cuál amortiguador sería más eficaz si se le agregara ion hidróxido?

10. Muchos azúcares fosforilados (ésteres de fosfato de azúcares) son intermediarios metabólicos. Los dos grupos —OH ionizables del grupo fosfato, en el éster monofosfato de ribosa (5-fosfato de ribosa) tienen valores de pK_a igual a 1.2 y 6.6. La forma totalmente protonada del 5-fosfato de α-D-ribosa tiene la siguiente estructura:

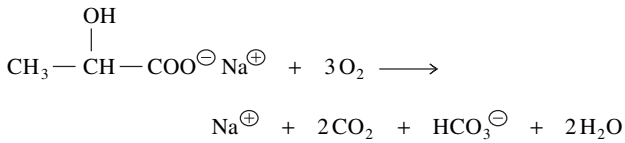


α-D-Ribosa 5-fosfato

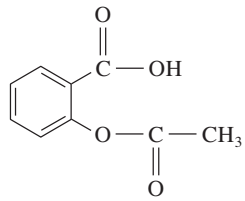
a) Dibuje, en orden, las especies iónicas que se forman al titular este azúcar fosforilado desde pH 0.0 hasta pH 10.0.
b) Trace la curva de titulación del 5-fosfato de ribosa.

11. En el caso normal, el CO_2 gaseoso es espirado con eficiencia por los pulmones. Bajo ciertas condiciones, como la enfermedad obstructiva pulmonar, o enfisema, la espiración se altera. El exceso de CO_2 que se produce en el organismo puede causar acidosis respiratoria, estado en que se acumula el exceso de ácido en los líquidos corporales. ¿Cómo es que causa acidosis respiratoria el exceso de CO_2?

12. Los compuestos orgánicos en las dietas de los animales son fuente de iones básicos y pueden ayudar a combatir los tipos no respiratorios de acidosis. Muchas frutas y verduras contienen sales de ácidos orgánicos que se pueden metabolizar como se muestra abajo en el caso del lactato de sodio. Explique cómo pueden ayudar las sales de ácidos en la dieta a aliviar la acidosis metabólica.



13. La absorción de los alimentos en el estómago y los intestinos depende de la capacidad de las moléculas para penetrar las membranas celulares y pasar al torrente sanguíneo. Como es más probable que sean absorbidas las moléculas hidrofóbicas que las moléculas hidrofílicas o cargadas, la absorción de las medicinas por administración oral puede depender de sus valores de pK_a y del pH de los órganos digestivos. La aspirina (ácido acetilsalicílico) tiene un grupo carboxilo ionizable (pK_a = 3.5). Calcule el porcentaje de la forma protonada de aspirina, disponible para su absorción en el estómago (pH = 2.0) y en el intestino (pH = 5.0).

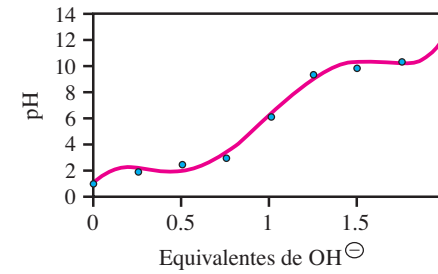


Aspirina

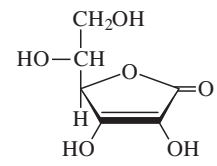
14. ¿Qué porcentaje de glicinamida, $^{\oplus}H_3NCH_2CONH_2$ (pK_a = 8.20) no está protonado a a) pH = 7.5, b) pH = 8.2 y c) pH = 9.0?

15. Vea la siguiente tabla y la curva de titulación para determinar a cuál compuesto de la tabla corresponde la curva de titulación.

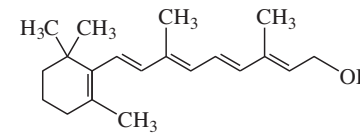
Compuesto	pK_1	pK_2	pK_3
Ácido fosfórico	2.15	7.20	12.15
Ácido acético	4.76		
Ácido succínico	4.21	5.64	
Ácido bórico	9.24	12.74	
Glicina	2.40	9.80	



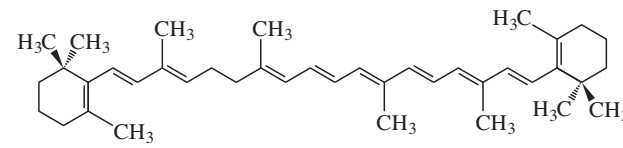
16. Indique cuál(es) de la(s) sustancia(s) siguientes es (o son) soluble(s) en agua.



a) Vitamina C



b) Vitamina A



c) β-caroteno

Lecturas seleccionadas

Agua

Chaplin, M. F. (2001) Water, its importance to life. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 29:54-59. Este artículo resume algunas de las importantes propiedades biológicas del agua y avanza bastante respecto a la descripción que contienen muchos libros de texto.

Stillinger, F. H. (1980). Water revisited. *Science* 209:451-457. Resumen y evolución de experimentos cuyo objeto es determinar la estructura del agua líquida.

Verkman, A. S. (2001). Solute and macromolecular diffusion in cellular aqueous compartments. *Trends Biochem. Sci.* 27:27-33. Breve repaso de experimentos recientes para medir velocidades de difusión en el interior de una célula.

Interacciones no covalentes

Frest, A. R. (1987). The hydrogen bond in molecular recognition. *Trends Biochem. Sci.* 12:301-304. Descripción de la fuerza de las interacciones de enlazamiento a través de puentes de hidrógeno en los complejos enzima-sustrato y en ADN.

Frieden, E. (1975). Non-covalent interactions. *J. Chem. Educ.* 52:754-761. Repaso de las clases de interacciones no covalentes que hay en sistemas biológicos, con diversos ejemplos.

Tanford, C. (1980). *The Hydorphobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes.* 2nd Ed. (Nueva York: John Wiley & Sons). Descripción completa de micelas e interacciones hidrofóbicas.

Cálculos bioquímicos

Montgomery, R. y Swenson, C. A. (1976). *Quantitative Problems in Biochemical Sciences,* 2nd Ed. (San Francisco: W. H. Freeman).

Segel, I. H. (1976). *Biochemical Calculations*: *How to solve Mathematical Problems in General Biochemistry*, 2nd Ed. (Nueva York: John Wiley & Sons).

Soluciones amortiguadoras

Stoll, V. S., y Blanchard, J. S. (1990). Buffers: principles and practice. *Methods Enzymol.* 182:24-38. Una guía práctica para seleccionar y preparar soluciones amortiguadoras.

3

capítulo tres

Los aminoácidos y la estructura primaria de las proteínas

El estudio de las proteínas ha ocupado a los bioquímicos durante más de un siglo. Comprender las composiciones, formas tridimensionales y actividades químicas de estas biomoléculas puede ser la clave para acometer algunos de los desafíos científicos más apremiantes. Por ejemplo, el proceso de la fotosíntesis es una de las rutas bioquímicas más importantes, por su papel en la captación de la energía solar. Un examen estructural detallado de las numerosas proteínas que efectúan la fotosíntesis está permitiendo comprender este proceso fundamental. Otra área activa de investigación es el estudio de las proteínas de bacterias termófilas. Esas bacterias prosperan a altas temperaturas, en algunos casos mayores que 100°C, pero llevan a cabo las mismas clases de reacciones bioquímicas comunes que todas las células. ¿Qué tienen de diferente las proteínas de las bacterias termófilas que les permite desarrollar actividad a temperaturas que destruirían a la mayoría de las demás bacterias?

Muchos problemas relacionados con la medicina requieren comprender las proteínas y su forma de trabajar. Uno de estos casos es el virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1), vinculado con el SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida). Como la mayor parte de los retrovirus, éste muta con mucha frecuencia y produce cepas nuevas que son resistentes a los tratamientos normales. Hoy se sabe que la enzima decisiva de la alta frecuencia de mutaciones es la transcriptasa reversa y se han estudiado con detalle su estructura y funciones. También son conocidas las estructuras de las proteínas de la cubierta vírica, cuyos genes mutan en las cepas nuevas. Los investigadores están descubriendo la forma en que esas mutaciones permiten a los virus superar las mejores defensas que puede crear la ciencia médica. Es de esperarse que esta información conduzca a mejores tratamientos del SIDA y otras enfermedades causadas por retrovirus.

Hay muchas clases distintas de proteínas. La lista que sigue, aunque incompleta, contiene la mayor parte de las funciones biológicas importantes de las proteínas.

Arriba: L-Arginina, uno de los 20 aminoácidos comunes.

1. Muchas proteínas actúan como enzimas, los catalizadores bioquímicos. Las enzimas catalizan casi todas las reacciones que suceden en los organismos vivos.
2. Algunas proteínas se unen con otras moléculas para su almacenamiento y transporte. Por ejemplo, la mioglobina se enlaza con el oxígeno en las células de los músculos esquelético y cardiaco, mientras que la hemoglobina se une y transporta al O_2 y al CO_2 en los glóbulos rojos.
3. Algunas proteínas, como la tubulina, actina y colágena, proporcionan soporte y forma a las células, y en consecuencia a los tejidos y los organismos.
4. Los conjuntos de proteínas pueden efectuar trabajo mecánico, como el movimiento de flagelos, la separación de cromosomas en la mitosis y la contracción de los músculos.
5. Muchas proteínas desempeñan un papel en la descodificación de la información celular. Algunas intervienen en la traducción, mientras que otras juegan un papel en la regulación de la expresión genética al unirse a los ácidos nucleicos.
6. Algunas proteínas son hormonas que regulan las actividades bioquímicas en las células o los tejidos blancos; otras proteínas sirven como receptores de las hormonas.
7. Algunas proteínas desarrollan funciones muy especializadas. Por ejemplo, los anticuerpos defienden a los vertebrados contra infecciones bacterianas y víricas, y las toxinas, que producen algunas bacterias, matan organismos mayores.

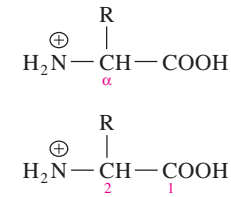
Se dará inicio al estudio de las proteínas —que también se llaman polipéptidos— explorando las estructuras y propiedades químicas de sus aminoácidos componentes. En este capítulo también se describe la purificación, análisis y secuenciación de polipéptidos. En el capítulo 4 se presentará la estructura tridimensional de las cadenas plegadas de polipéptidos. Los capítulos 5 y 6 describen las propiedades de las enzimas.

3.1 Estructura general de los aminoácidos

Todos los organismos emplean los mismos 20 aminoácidos como bloques constructivos para armar las moléculas de proteína. A estos 20 aminoácidos se les llama aminoácidos *comunes*, *estándar* o *normales*. A pesar de la poca cantidad de los aminoácidos, se puede obtener una variedad enorme de distintos polipéptidos al unir los 20 aminoácidos comunes para formar distintas combinaciones.

Los aminoácidos se llaman así porque son derivados aminados de ácidos carboxílicos. En los 20 aminoácidos comunes, los grupos amino y carboxilo están unidos al mismo átomo de carbono: el átomo de carbono α. Así, todos los aminoácidos estándar que contienen las proteínas son α-aminoácidos. Al carbono α se unen otros dos sustituyentes: un átomo de hidrógeno y una cadena lateral (R) que es única para cada aminoácido. En los nombres químicos de los aminoácidos, los átomos de carbono se identifican con números que comienzan en el átomo de carbono del grupo carboxilo. [El nombre químico correcto, o nombre sistemático, se apega a reglas establecidas por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, de *International Union of Pure and Applied Chemistry*) y la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB, de *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*)]. Si el grupo R es —CH_3, el nombre sistemático de ese aminoácido sería ácido 2-aminopropanoico. (El ácido propanoico es CH_3—CH_2—COOH). El nombre trivial de CH_3—$CH(NH_2)$—COOH es alanina. Hay una nomenclatura alternativa que usa letras griegas para identificar al carbono α y los átomos de carbono de la cadena lateral. La nomenclatura alternativa identifica al átomo de carbono en relación con el grupo carboxilo, por lo que no se especifica al átomo de carbono del grupo carboxilo, a diferencia de la nomenclatura sistemática, donde ese carbono tiene el número 1. Los bioquímicos han usado, por tradición, la nomenclatura alternativa.

Dentro de una célula, bajo condiciones fisiológicas normales, el grupo amino está protonado (—$NH_3^{\oplus}$) porque el pKa de este grupo es cercano a 9. El grupo carboxilo



▲ Convenciones de numeración para aminoácidos. En los nombres tradicionales, los átomos de carbono adyacentes al grupo carboxilo se identifican por las letras griegas α, β, γ, etc. En la nomenclatura oficial de IUPAC/IUBMB para nombres químicos, o nombres sistemáticos, el átomo de carbono del grupo carbonilo tiene el número 1, y los carbonos adyacentes se numeran en forma secuencial. Entonces, el carbono α en los nombres tradicionales es el átomo de carbono 2 en los nombres sistemáticos.

está ionizado (—$COO^{\ominus}$) porque el pK_a de ese grupo es menor que 3, como se estudió en la sección 2.9. Así, en el intervalo fisiológico de pH, que es de 6.8 a 7.4, los aminoácidos son **zwitteriones**, o iones dipolares, aunque su carga neta pueda ser cero. Habrá ocasión de ver, en la sección 3.4, que algunas de las cadenas laterales se pueden ionizar también. Los investigadores representan siempre las estructuras de los aminoácidos en formas que tengan importancia biológica, y es la razón por la cual el lector verá zwitteriones en las figuras siguientes.

La figura 3.1a muestra la estructura general de un aminoácido en perspectiva. La figura 3.1b presenta un modelo de bolas y palillos para un aminoácido representativo, la serina, cuya cadena lateral es —CH_2OH. Los átomos de carbono de una cadena lateral se identifican en sucesión como β, γ, δ y ε, que indican los carbonos 3, 4, 5 y 6, respectivamente. El nombre sistemático de la serina es ácido 2-amino-3-hidroxipropanoico.

En 19 de los 20 aminoácidos que se usan en la biosíntesis de proteínas, el átomo de carbono α es **quiral**, o asimétrico, porque tiene cuatro grupos diferentes unidos a él. La excepción es la glicina, cuyo grupo R sólo es un átomo de hidrógeno (la molécula no es quiral, porque el átomo de carbono α está unida a dos átomos idénticos de hidrógeno). Los 19 aminoácidos quirales pueden, en consecuencia, existir como estereoisómeros. Los **estereoisómeros** son compuestos que tienen la misma fórmula molecular pero difieren en el orden o configuración de sus átomos en el espacio. Los dos estereoisómeros son moléculas distintas que no se pueden interconvertir con facilidad entre sí ya que un cambio de configuración requiere romper uno o más enlaces. Los estereoisómeros de aminoácidos no son imágenes especulares (es decir, imágenes en espejo) superponibles; a dichos estereoisómeros se les llama **enantiómeros**. Dos de los 19 aminoácidos quirales, la isoleucina y la treonina, presentan dos átomos quirales de carbono cada uno. La isoleucina y la treonina pueden formar, cada una, cuatro estereoisómeros diferentes.

Por convención, los pares de imágenes especulares de aminoácidos se indican como D (por dextro, de *dexter*, derecho en latín) y L (por levo, de *laevus*, izquierdo en latín). La configuración del aminoácido de la figura 3.1a es L; la de su imagen especular es D. Para asignar la identificación estereoquímica se traza la fórmula del aminoácido en dirección vertical, con su grupo α-carboxilato en la parte superior y su cadena lateral en la parte inferior, ambas alejándose del espectador. En esta orientación, el grupo α-amino del isómero L está a la izquierda del carbono α y el del isómero D está a la derecha, como se ve en la figura 3.2. (Los cuatro átomos unidos al carbono α ocupan las cuatro esquinas de un tetraedro, en forma muy parecida a como los átomos de hidrógeno se unen al oxígeno en el agua, según se representa en la figura 2.4).

Los 19 aminoácidos quirales con los que se ensamblan las proteínas presentan la configuración L, aunque en la naturaleza se encuentran unos pocos D-aminoácidos. Por convención, se supone que los aminoácidos tienen la configuración L, a menos que se

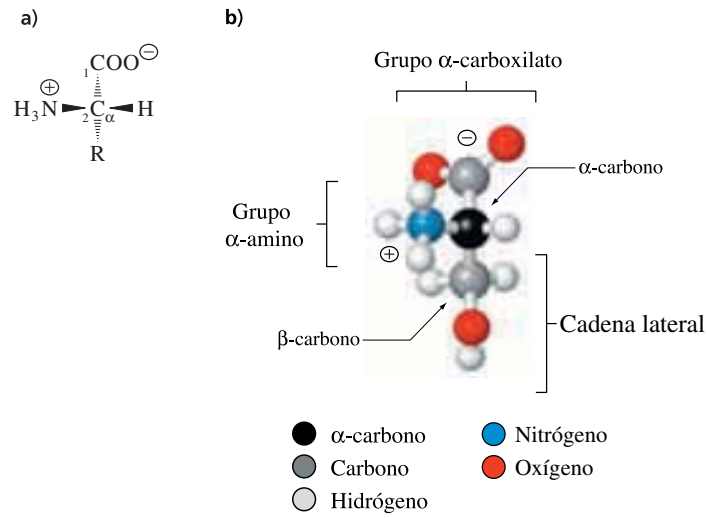
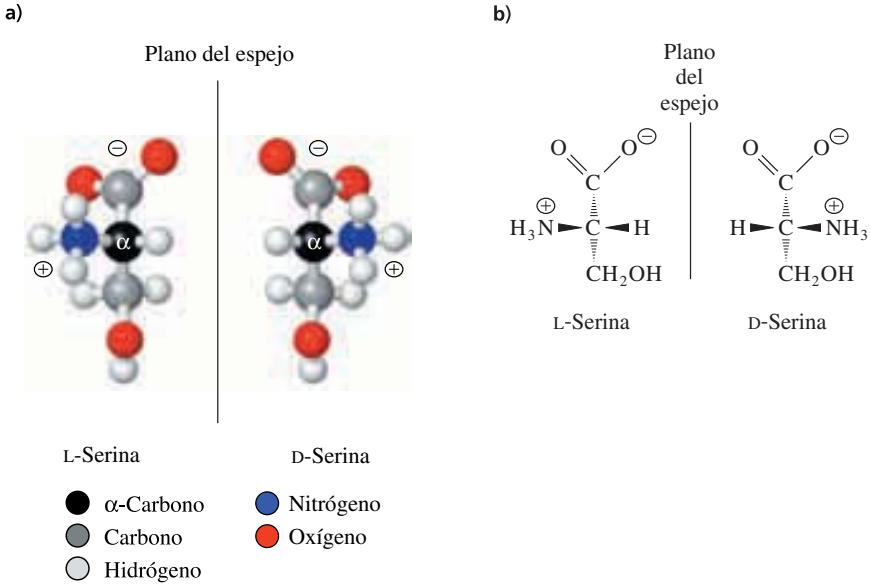


Figura 3.1 ▶
Dos representaciones de un L-aminoácido a pH neutro. **a)** Estructura general. Un aminoácido tiene un grupo carboxilato (donde el átomo de carbono es el C-1), un grupo amino, un átomo de hidrógeno y una cadena lateral (o grupo R), todos unidos al C-2 (el carbono α). Las cuñas llenas indican los enlaces arriba del plano del papel, las cuñas entrecortadas indican enlaces atrás del plano del papel. Los extremos grandes de las cuñas están más cerca del espectador que los extremos puntiagudos. **b)** Modelo de bolas y palillos de la serina (cuyo grupo R es —CH_2OH). Obsérvense los sistemas alternativos de numeración y letras para los átomos de carbono. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).



◀ Figura 3.2
Pares de imágenes especulares de aminoácidos. **a)** Modelos de bolas y palillos de L-serina y D-serina. Obsérvese que las dos moléculas no son idénticas; no se pueden sobreponer. **b)** L-Serina y D-serina. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

indique específicamente que son D. Con frecuencia se aconseja dibujar las estructuras de los L-aminoácidos en una forma no comprometida estereoquímicamente, en especial cuando no es crítica para determinada descripción una representación estereoquímica correcta.

El hecho de que todos los organismos vivos empleen los mismos aminoácidos estándar en la síntesis de sus proteínas es prueba de que todas las especies en la Tierra descienden de un ancestro común. Al igual que los organismos modernos, el último ancestro común (LCA, de *last common ancestor*) debe haber usado aminoácidos L y no D. Mezclas de L- y D-aminoácidos se forman bajo condiciones que semejan las que imperaban cuando apareció por primera vez la vida en la Tierra, hace 4000 millones de años, y ambos enantiómeros se encuentran en meteoritos y en la cercanía de las estrellas. No se sabe cómo o por qué las formas primitivas de vida seleccionaron los aminoácidos L en la mezcla hipotética de enantiómeros presente cuando apareció por primera vez la vida. Es probable que las primeras proteínas estuvieran formadas por una pequeña cantidad de aminoácidos simples, y la selección de aminoácidos L frente a aminoácidos D fuera un evento aleatorio. Los organismos vivos modernos no seleccionan aminoácidos L de una mezcla ya que sólo sintetizan aminoácidos L en cantidades suficientes. Así, el predominio de aminoácidos L en las especies modernas se debe a la evolución de las rutas metabólicas que producen aminoácidos L y no aminoácidos D (capítulo 17).

3.2 Estructuras de los 20 aminoácidos comunes

Las estructuras de los 20 aminoácidos que suelen encontrarse en las proteínas se muestran en las figuras siguientes, como proyecciones de Fischer. En las proyecciones de Fischer, los enlaces horizontales en un centro quiral se extienden hacia el espectador y los verticales se alejan (como en las figuras 3.1 y 3.2). El examen de las estructuras revela que hay considerable variación en las cadenas laterales de los 20 aminoácidos. Algunas cadenas laterales son no polares, y en consecuencia hidrofóbicas, mientras que otras son polares o ionizadas a pH neutro y en consecuencia son hidrofílicas. Las propiedades de las cadenas laterales tienen gran influencia sobre la forma tridimensional general, o conformación, de una proteína. Por ejemplo, la mayor parte de las cadenas laterales hidrofóbicas de una proteína hidrosoluble se pliegan hacia el interior y le proporcionan a la proteína una forma compacta y globular.

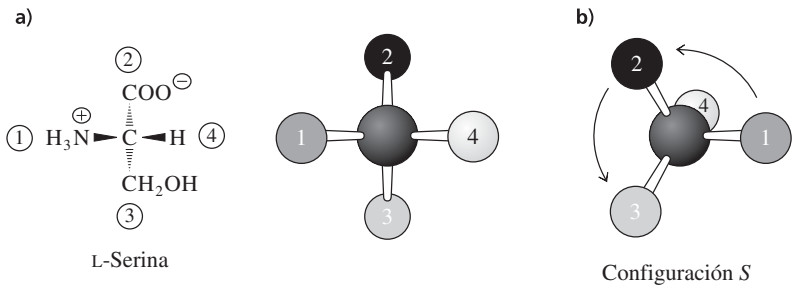
En la sección 3.3 se describen algunos aminoácidos no estándar.

RECUADRO 3.1 Una nomenclatura alternativa

El sistema *RS* de nomenclatura de configuración también se usa a veces para describir los centros quirales en los aminoácidos. Este sistema *RS* se basa en asignar una secuencia de prioridades a los cuatro grupos unidos a un átomo de carbono quiral. Una vez asignadas, las prioridades de grupo se usan para establecer la configuración de la molécula. Las prioridades se numeran del 1 al 4 y se asignan a grupos, de acuerdo con las reglas siguientes:

1. Para átomos unidos directamente al carbono quiral, al que tenga la masa atómica menor se le asigna la prioridad mínima (número 4).
2. Si hay dos átomos idénticos unidos al carbono quiral, se decide la prioridad por la masa atómica de los siguientes átomos unidos. Por ejemplo, un grupo —CH_3 tiene menor prioridad que un grupo —CH_2Br porque el hidrógeno tiene menor masa atómica que el bromo.
3. Si un átomo está unido con un enlace doble o triple, se cuenta una vez por cada enlace formal. Así, el —CHO, con doble enlace con el oxígeno, tiene mayor prioridad que el —CH_2OH. El orden de prioridades de los grupos más comunes, de menor a mayor, es —H, —CH_3, —C_6H_5, —CH_2OH, —CHO, —COOH, —COOR, —NH_2, —NHR, —OH, —OR y —SH.

Con estas reglas en mente, imagínese el lector que la molécula es el volante de un automóvil, con el grupo de prioridad mínima (número 4) alejándose de usted (como la columna de la dirección) y los otros tres grupos en torno a la orilla del volante. Siga la orilla del volante, moviéndose desde el grupo de máxima prioridad hacia el grupo de mínima prioridad (1, 2, 3). Si el movimiento es en el sentido de las manecillas del reloj, la configuración es *R* (de *rectus*, derecho en latín). Si el movimiento es contrario al de las manecillas del reloj, la configuración es *S* (de *sinister*, izquierdo en latín). La figura demuestra la asignación de la configuración *S a la* L-serina de acuerdo con el sistema *RS*. La L-cisteína tiene la configuración opuesta, *R*. Como no todos los aminoácidos que hay en las proteínas tienen la misma designación *RS*, en bioquímica se usa con más frecuencia el sistema DL.



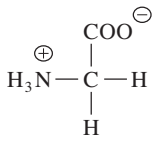
◀ Asignación de configuración de acuerdo con el sistema *RS*. **a)** Cada grupo unido a un carbono quiral recibe una prioridad con base en su masa atómica; la prioridad mínima es 4. **b)** Orientando la molécula con el grupo de prioridad 4 alejándose (atrás del carbono quiral) y siguiendo la trayectoria desde el grupo de máxima prioridad al de mínima prioridad, se puede establecer la configuración absoluta. Si la secuencia 1, 2, 3 tiene el sentido de las manecillas del reloj, la configuración es *R*. Si la secuencia 1, 2, 3 tiene sentido contrario al de las manecillas del reloj, su configuración es *S*. La L-serina tiene la configuración *S*.

En las figuras se usan las abreviaturas de tres y de una letra para indicar cada aminoácido. La abreviatura de tres letras es evidente (en inglés), pero la abreviatura simple de una letra es menos obvia. Varios aminoácidos comienzan con la misma letra, de modo que se deben usar otras letras del alfabeto para tener una designación adecuada; por ejemplo, treonina = T, tirosina = Y y triptófano = W. Estos identificadores se deben memorizar.

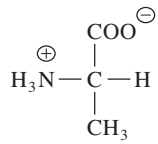
Es importante aprenderse las estructuras de los aminoácidos estándar porque se mencionarán con frecuencia en los capítulos sobre estructura de proteínas, enzimas y síntesis de proteínas. En las secciones que siguen los aminoácidos estándar se agruparon por sus propiedades generales y las estructuras químicas de sus cadenas laterales. Las cadenas laterales pertenecen a las siguientes clases químicas: alifática, aromática, sulfurada, alcohol, base, ácido y amida. De los 20 aminoácidos, cinco se subdividen en muy (o *altamente*) hidrofóbicos (en gris claro) y siete se clasifican como muy hidrofílicos (en negro). Comprender la clasificación de los grupos R simplificará la memorización de las estructuras y los nombres.

A. Grupos R alifáticos

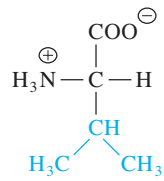
La glicina (Gly, G) es el aminoácido más pequeño porque su grupo R no es más que un átomo de hidrógeno; en consecuencia, el carbono α de la glicina no es quiral. Los dos átomos de hidrógeno del carbono α de la glicina imparten poco carácter hidrofóbico a la molécula. Después habrá oportunidad de comprobar que la glicina desempeña un papel único en la estructura de muchas proteínas porque su cadena lateral es lo bastante pequeña como para tener cabida en nichos en los que a otros aminoácidos les resultaría imposible hacerlo.



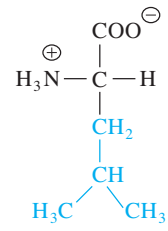
Glicina [G] (Gly)



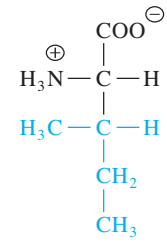
Alanina [A] (Ala)



Valina [V] (Val)



Leucina [L] (Leu)



Isoleucina [I] (Ile)

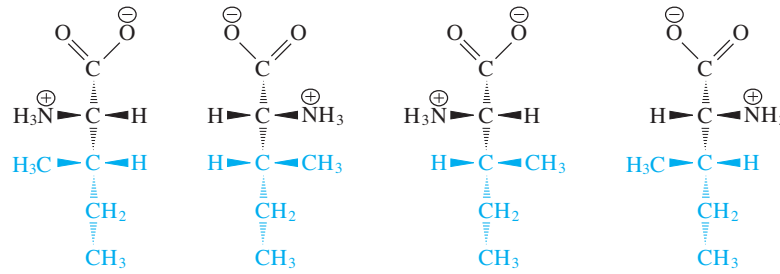
Hay cuatro aminoácidos: alanina (Ala, A), valina (Val, V), leucina (Leu, L) y el isómero estructural de la leucina, isoleucina (Ile, I), que tienen cadenas laterales alifáticas saturadas. La cadena lateral de la alanina es un grupo metilo, mientras que la valina presenta una cadena lateral ramificada con tres carbonos, y la leucina y la isoleucina contienen una cadena lateral ramificada de cuatro carbonos cada una. Los átomos de carbono α y β de la isoleucina son asimétricos. Ya que la isoleucina tiene dos centros quirales, posee cuatro estereoisómeros posibles. El estereoisómero que presentan las proteínas se denomina L-isoleucina, y el aminoácido que difiere en el carbono α se llama L-aloisoleucina (figura 3.3, en la página siguiente). Los otros dos estereoisómeros son la D-isoleucina y la D-aloisoleucina.

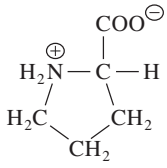
RECUADRO 3.2 Nombres comunes de aminoácidos

Alanina	probablemente de aldehído + "an" (por comodidad) + amina (1849)
Arginina	cristaliza como sal de plata; de *argentum*, plata, en latín (1886)
Asparagina	se aisló en los espárragos, por primera vez (1813)
Aspartato	similar a la asparagina (1836)
Glutamato	se identificó por primera vez en el gluten de proteína vegetal (1866)
Glutamina	similar al glutamato (1866)
Glicina	de *glykys* (dulce en griego). Sabor dulce (1848)
Cisteína	de *kystis*, vejiga en griego; se descubrió en cálculos de la vejiga (1882)
Histidina	se aisló por primera vez en el esperma de esturión. El nombre viene de *histidin*, tejido en griego (1896)
Isoleucina	isómero de la leucina
Leucina	de *leukos*, blanco en griego. Forma cristales blancos (1820)
Lisina	producto de hidrólisis de proteínas; de *lysis*, aflojamiento en griego (1891)
Metionina	la cadena lateral es un átomo de azufre (*theion*, azufre en griego) con un grupo metilo (1928)
Fenilalanina	alanina con un grupo fenilo (1883)
Prolina	forma corrompida de "pirrolidina" porque forma un anillo de pirrolidina (1904)
Serina	de *sericum*, seda en latín; la serina es común en la seda (1865)
Treonina	parecido al azúcar treosa, con cuatro carbonos (1936)
Triptófano	aislado de un digerido tríptico de proteína + *phanein* (aparecer, en griego) (1890)
Tirosina	está en el queso, de *tyros*, queso en griego (1890)
Valina	derivado del ácido valérico, de la planta del género *Valeriana* (1906)

Fuentes: Oxford English Dictionary, 2ª Ed. y Leung, S. H. (2000) "Amino Acids, Aromatic Compounds, and Carboxylic Acids. How Did They Get Their Common Names?". J. Chem. Educ. 77:48-49.

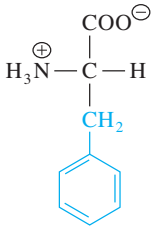
Figura 3.3 ▶
Estereoisómeros de la isoleucina.

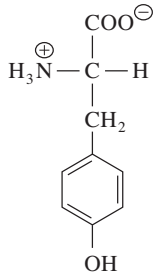



Prolina [P]
(Pro)

La alanina, valina, leucina e isoleucina desempeñan un papel importante en el establecimiento y mantenimiento de las estructuras tridimensionales de las proteínas por su tendencia a agruparse lejos del agua. La valina, leucina e isoleucina se conocen como aminoácidos de cadena ramificada porque sus cadenas laterales de átomos de carbono contienen ramificaciones. Los tres aminoácidos son muy hidrofóbicos.

La prolina (Pro, P) difiere de los 19 aminoácidos porque su cadena lateral de tres carbonos está unida al nitrógeno de su grupo α-amino y también al carbono α formando una molécula cíclica. El resultado es que la prolina contiene un grupo amino secundario y no uno primario. El anillo heterocíclico de pirrolidina en la prolina restringe la geometría de los polipéptidos, en los que introduce a veces cambios abruptos en la dirección de la cadena del péptido. La estructura cíclica de la prolina la vuelve mucho menos hidrofóbica que valina, leucina e isoleucina.

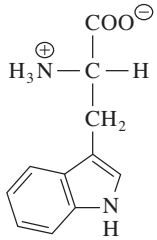

Fenilalanina [F]
(Phe)


Tirosina [Y]
(Tyr)

B. Grupos R aromáticos

La fenilalanina (Phe, F), tirosina (Tyr, Y) y el triptófano (Trp, W) presentan cadenas laterales con grupos aromáticos. En el caso de la fenilalanina es una cadena hidrofóbica bencílica. La tirosina se parece estructuralmente a la fenilalanina; en la tirosina, un grupo hidroxilo (—OH) sustituye al hidrógeno *para* de la fenilalanina lo que la convierte en un fenol. El grupo hidroxilo de la tirosina es ionizable, pero bajo condiciones fisiológicas normales retiene su hidrógeno. La cadena lateral del triptófano contiene un grupo indol bicíclico. La tirosina y el triptófano no son tan hidrofóbicos como la fenilalanina porque en sus cadenas laterales hay grupos polares.

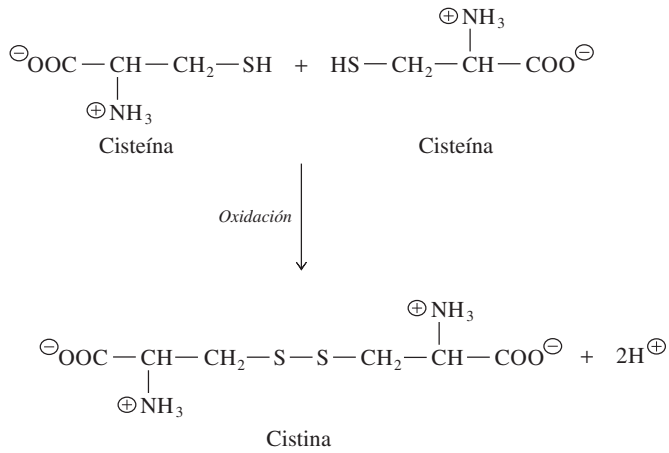
Los tres aminoácidos aromáticos absorben luz ultravioleta (UV) porque, a diferencia de los aminoácidos alifáticos, los aromáticos contienen electrones π deslocalizados. A pH neutro tanto el triptófano como la tirosina absorben luz a una longitud de onda de 280 nm, mientras que la fenilalanina es casi transparente a 280 nm y absorbe débilmente luz a 260 nm. Dado que la mayor parte de las proteínas contienen triptófano y tirosina éstas absorben luz a 280 nm. La absorbencia a 280 nm se usa en forma rutinaria para estimar la concentración de proteínas en las soluciones.


Triptófano [W]
(Trp)

C. Grupos R sulfurados

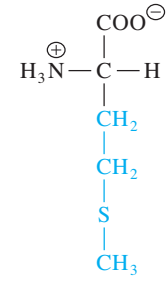
La metionina (Met, M) y la cisteína (Cys, C) son los dos aminoácidos azufrados. La metionina contiene un grupo tioéter metilo, no polar, en su cadena lateral, lo que la convierte en uno de los aminoácidos más hidrofóbicos. La metionina desempeña un papel especial en la síntesis de proteínas porque casi siempre representa el primer aminoácido en una cadena de polipéptido. La estructura de la cisteína se parece a la de la alanina, con un átomo de hidrógeno reemplazado por un grupo sulfhidrilo (—SH).

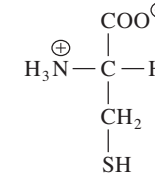
Aunque la cadena lateral de la cisteína es algo hidrofóbica, también es muy reactiva. Debido a que el átomo de azufre es polarizable, el grupo sulfhidrilo de la cisteína puede formar puentes de hidrógeno débiles con el oxígeno y el nitrógeno. Además, el grupo sulfhidrilo de la cisteína es un ácido débil, lo cual le permite perder un protón y transformarse en un ion tiolato con carga negativa.



◀ Figura 3.4
Formación de la cistina. Cuando una oxidación une los grupos sulfhidrilo de dos moléculas de cisteína el compuesto que resulta es un disulfuro llamado cistina.

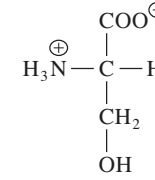
Un compuesto llamado cistina se puede aislar cuando se hidrolizan algunas proteínas. La cistina se forma con dos moléculas oxidadas de cisteína unidas por un enlace disulfuro (figura 3.4). La oxidación de los grupos sulfhidrilo de las moléculas de cisteína sucede con más facilidad a valores de pH ligeramente alcalinos porque los grupos sulfhidrilo se ionizan a pH alto. Las dos cadenas laterales de cisteína deben ser adyacentes en la estructura tridimensional espacial para formar un puente de disulfuro, pero no necesitan estar cercanas entre sí en la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica. Hasta se pueden encontrar en distintas cadenas polipetídicas. Los enlaces o puentes disulfuro pueden estabilizar las estructuras tridimensionales de algunas proteínas por enlaces cruzados entre residuos de cisteína en las cadenas peptídicas. (La mayor parte de las proteínas carece de puentes de disulfuro porque las condiciones imperantes en el interior de las células no favorecen la oxidación. Sin embargo, muchas proteínas secretadas o extracelulares contienen puentes disulfuro).

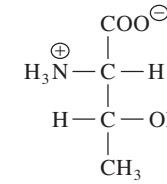

Metionina [M]
(Met)


Cisteína [C]
(Cys)

D. Cadenas laterales con grupos alcohol

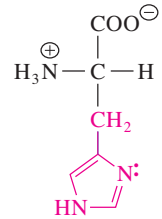
La serina (Ser, S) y la treonina (Thr, T) tienen cadenas laterales polares sin carga que contienen grupos β-hidroxilo. Estos grupos alcohol dan carácter hidrofílico a las cadenas laterales alifáticas. Además de la cadena lateral fenólica más ácida de la tirosina, los grupos hidroxilo de la serina y la treonina despliegan las propiedades débiles de ionización de los alcoholes primarios y secundarios. El grupo hidroximetilo de la serina (—CH_2OH) no se ioniza en forma apreciable en soluciones acuosas; empero, este alcohol puede reaccionar dentro de los sitios activos de varias enzimas como si estuviera ionizado. La treonina, como la isoleucina, cuenta con dos centros quirales, los átomos de carbono α y β. La L-treonina es el único de los cuatro estereoisómeros que se encuentra con frecuencia en las proteínas. (Los otros estereoisómeros son D-treonina, L-alotreonina y D-alotreonina).


Serina [S]
(Ser)

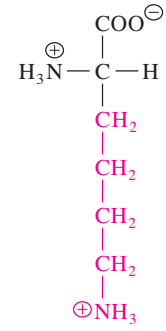

Treonina [T]
(Thr)

E. Grupos R básicos

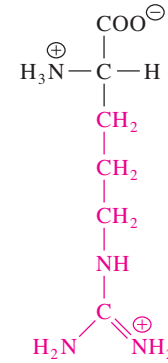
La histidina (His, H), lisina (Lys, K) y arginina (Arg, R) presentan cadenas laterales hidrofílicas que son bases nitrogenadas y tienen carga positiva a pH 7. La cadena lateral de la histidina contiene un sustituyente de anillo de imidazol. La forma protonada de este anillo se llama ion imidazolio (sección 3.4). La lisina es un diaminoácido y tiene grupos amino α y ε al mismo tiempo. El grupo ε-amino existe como ion alquilamonio (—CH_2—$NH_3^{\oplus}$) a pH neutro y confiere una carga positiva a las proteínas. La arginina es el más básico de los 20 aminoácidos porque su cadena lateral de ion guanidinio está protonada bajo todas las condiciones que se encuentran de manera habitual dentro de una célula. Las cadenas laterales de arginina también aportan cargas positivas a las proteínas.



Histidina [H]
(His)



Lisina [K]
(Lys)



Arginina [R]
(Arg)

TABLA 3.1 Escala de hidropatía para residuos de aminoácidos

Aminoácido	Cambio de energía libre para transferencia[a] (kJ mol^{-1})
Muy hidrofóbicos	
Isoleucina	3.1
Fenilalanina	2.5
Valina	2.3
Leucina	2.2
Metionina	1.1
Menos hidrofóbicos	
Triptófano	1.5[b]
Alanina	1.0
Glicina	0.67
Cisteína	0.17
Tirosina	0.08
Prolina	−0.29
Treonina	−0.75
Serina	−1.1
Muy hidrofílicos	
Histidina	−1.7
Glutamato	−2.6
Asparagina	−2.7
Glutamina	−2.9
Aspartato	−3.0
Lisina	−4.6
Arginina	−7.5

[a] El cambio de energía libre es para transferencia de un residuo de aminoácido del interior de una bicapa lipídica al agua.

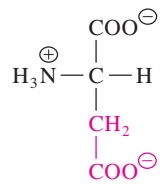
[b] En otras escalas, el triptófano tiene menor valor de hidropatía.

[Adaptado de Eisenberg, D., Weiss, R. M., Terwilliger, T. C., Wilcox, W. (1982). Hydrophobic moments in protein structure. *Faraday Symp. Chem. Soc.* 17:109-120].

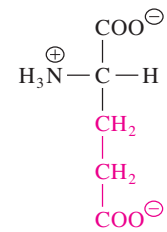
F. Grupos R ácidos y sus amidas derivadas

El aspartato (Asp, D) y el glutamato (Glu, E) son aminoácidos dicarboxílicos y tienen cadenas laterales hidrofílicas con carga negativa a pH 7. Además de los grupos carboxilo α, el aspartato posee un grupo carboxilo β y el glutamato un grupo carboxilo γ. El aspartato y el glutamato confieren carga negativa a las proteínas porque sus cadenas laterales se encuentran ionizadas a pH 7. A veces se les llama ácido aspártico y ácido glutámico, respectivamente, pero bajo la mayoría de las condiciones fisiológicas se encuentran como bases conjugadas y, al igual que otros carboxilatos, tienen el sufijo *ato*. Es probable que el glutamato sea conocido bajo la forma de su sal monosódica, el glutamato monosódico (MSG, de *monosodium glutamate*), que se usa en alimentos como intensificador de sabores.

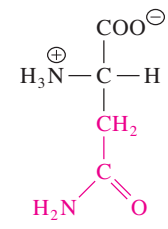
La asparagina (Asn, N) y la glutamina (Gln, Q) son las amidas del ácido aspártico y el ácido glutámico, respectivamente. Aunque las cadenas laterales de la asparagina y la glutamina son eléctricamente neutras, estos aminoácidos son muy polares y se encuentran con frecuencia en las superficies de las proteínas, donde pueden interactuar con moléculas de agua. Los grupos amida polares de la asparagina y la glutamina también pueden formar puentes de hidrógeno con las cadenas laterales de otros aminoácidos polares.



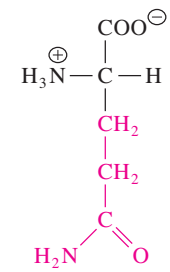
Aspartato [D]
(Asp)



Glutamato [E]
(Glu)



Asparagina [N]
(Asn)



Glutamina [Q]
(Gln)

G. Hidrofobicidad de las cadenas laterales de aminoácidos

Las diversas cadenas laterales en los aminoácidos van desde muy hidrofóbicas hasta muy hidrofílicas pasando por débilmente polares. La hidrofobicidad o hidrofilicidad (o *hidrofilia*) relativas de cada aminoácido se llama **hidropatía**. Hay varias formas de medir la hidropatía, pero la mayor parte de ellas se basa en calcular la tendencia del desempeño de un aminoácido en un ambiente hidrofóbico o uno hidrofílico. Una escala de hidropatía que se usa con frecuencia se muestra en la tabla 3.1. Los aminoácidos con valores de hidropatía muy positivos se consideran hidrofóbicos, mientras que aquellos con los mayores valores negativos se consideran hidrofílicos. Es difícil conocer los valores de hidropatía de algunos residuos de aminoácido que están cerca del centro de la escala. Por ejemplo, hay

cierta diferencia acerca de la hidrofilia del grupo indol en el triptófano y en algunas escalas a este aminoácido se le asigna un valor de hidropatía mucho menor.

La hidropatía es un determinante importante del plegamiento de cadenas de proteína porque las cadenas laterales hidrofóbicas tienden a estar agrupadas en el interior de una proteína y los residuos hidrofílicos en general se encuentran en la superficie. A pesar de ello, todavía es imposible asegurar por adelantado en forma precisa si determinado residuo se ubicará en el interior no acuoso de una proteína o sobre la superficie expuesta al solvente. Las medidas de hidropatía de los aminoácidos libres como los de la tabla 3.1 se usan para determinar cuáles segmentos de proteínas con superficie expuesta probablemente estén embebidos en una bicapa lipídica hidrofóbica (capítulo 9).

3.3 Otros aminoácidos y derivados de aminoácido

En los organismos vivos hay más de 200 aminoácidos diferentes. Además de los normales, que están incorporados en las proteínas, todas las especies contienen una diversidad de aminoácidos L que son precursores de los aminoácidos comunes, o bien son intermediarios en otras rutas bioquímicas. Como ejemplos están la homocisteína, homoserina, ornitina y citrulina (véase el capítulo 17). La *S*-adenosilmetionina (SAM) es un donador común de metilo en muchas rutas bioquímicas (sección 7.2). Varias especies de bacterias y de hongos sintetizan D-aminoácidos que se usan en las paredes celulares y en antibióticos peptídicos complejos, como la actinomicina D.

Algunos aminoácidos comunes sufren modificaciones químicas para producir aminas con importancia biológica. Se sintetizan con reacciones catalizadas por enzimas, que incluyen descarboxilación y desaminación. Por ejemplo, en el cerebro de los mamíferos, el glutamato se convierte en el neurotransmisor γ-aminobutirato (GABA) (figura 3.5a). También los mamíferos pueden sintetizar la histamina (figura 3.5b) a partir de la histidina. La histamina controla la constricción de ciertos vasos sanguíneos y también la secreción de ácido clorhídrico en el estómago. En la médula adrenal, la tirosina se metaboliza a epinefrina, que también se conoce como adrenalina (figura 3.5c). La epinefrina y su precursor, la norepinefrina (compuesto cuyo grupo amino carece de sustituyente metilo), son hormonas que ayudan a regular el metabolismo en los mamíferos. También la tirosina es precursor de las hormonas tiroideas tiroxina y triyodotironina (figura 3.5d). En la biosíntesis de las hormonas tiroideas se requiere yodo. Es común agregar pequeñas cantidades de yoduro de sodio a la sal de mesa para evitar el bocio, estado de hipotiroidismo debido a una falta de yodo en la dieta.

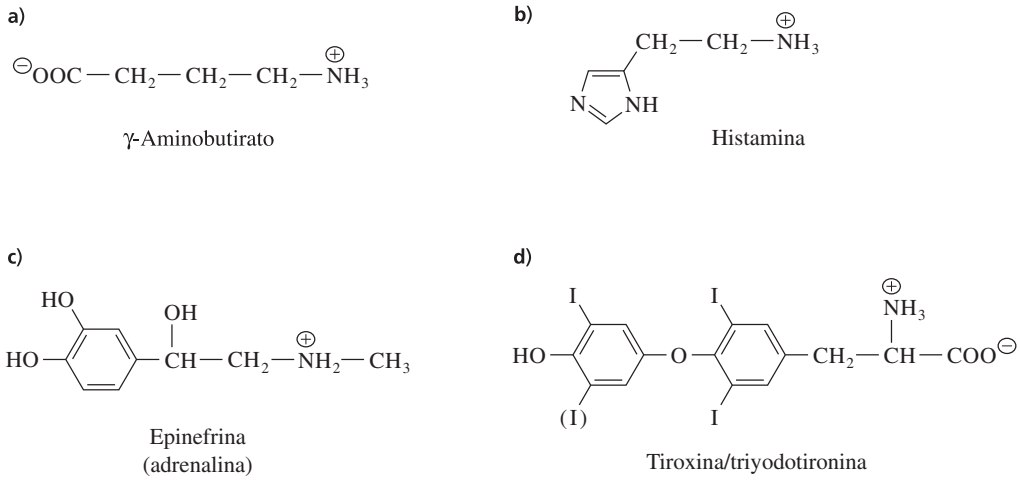
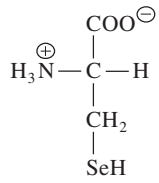
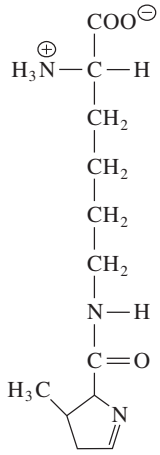


Figura 3.5 ▲
Compuestos derivados de aminoácidos comunes. **a)** γ-Aminobutirato, derivado del glutamato. **b)** Histamina, derivado de la histidina. **c)** Epinefrina, derivado de la tirosina. **d)** Tiroxina y triyodotironina, derivados de la tirosina. La tiroxina contiene un átomo de yodo más (entre paréntesis) que la triyodotironina.



Selenocisteína



Pirrolisina

Algunos aminoácidos se modifican químicamente después de incorporarse a los polipéptidos. Por ejemplo, algunos residuos de prolina en la proteína colágena se oxidan y forman residuos de hidroxiprolina (sección 4.11). Otra modificación común es la adición de cadenas complejas de carbohidratos, proceso llamado glicosilación (capítulos 8 y 22). Muchas proteínas se fosforilan por adición de grupos fosforilo a las cadenas laterales de serina, treonina o tirosina. La oxidación de pares de residuos de cisteína para formar cistina también sucede después que se sintetiza un polipéptido. En las bacterias, el primer aminoácido en una proteína suele ser metionina, que se modifica por adición de un grupo formilo para formar *N*-formilmetionina (capítulo 22).

Un descubrimiento sorprendente fue que un 21° aminoácido, la selenocisteína (que contiene selenio en lugar del azufre de la cisteína), está incorporado en unas pocas proteínas de algunas especies. La selenocisteína se forma a partir de la serina durante la síntesis de la proteína. El 22° aminoácido es la pirrolisina, que se encuentra en algunas especies de arqueobacterias. La pirrolisina es una forma modificada de lisina que se sintetiza antes de agregarse a una cadena creciente de polipéptidos por la maquinaria de traducción. La selenocisteína y la pirrolisina tienen sus propios codones y es la razón por la que se les considera adiciones al repertorio normal de precursores de proteína. Debido a modificaciones posteriores a la traducción, muchas proteínas completas contienen más de los 22 aminoácidos estándar que se emplean en la síntesis de proteínas.

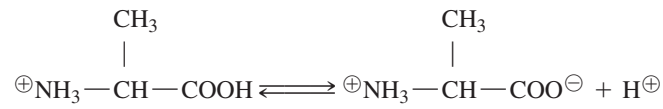
3.4 Ionización de los aminoácidos

Las propiedades físicas de los aminoácidos reciben influencias de los estados iónicos de los grupos α-carboxilo y α-amino y de todos los grupos ionizables que haya en las cadenas laterales. Cada grupo ionizable guarda relación con un valor específico de pK_a, que corresponde al pH al que son iguales las concentraciones de las formas protonada y no protonada (sección 2.9). Cuando el pH de la solución es menor que el pK_a, predomina la forma protonada y el aminoácido es entonces un ácido real, capaz de donar un protón. Cuando el pH de la solución es mayor que el pK_a del grupo ionizable, la forma no protonada de ese grupo predomina, y el aminoácido existe en forma de base conjugada, que es aceptora de protones. Cada aminoácido tiene al menos dos valores de pK_a que corresponden a la ionización de los grupos α-carboxilo y α-amino. Además, siete de los aminoácidos comunes tienen cadenas laterales ionizables con valores adicionales y medibles de pK_a. Esos valores difieren entre los aminoácidos. Así, a determinado pH, con frecuencia los aminoácidos tienen cargas netas diferentes.

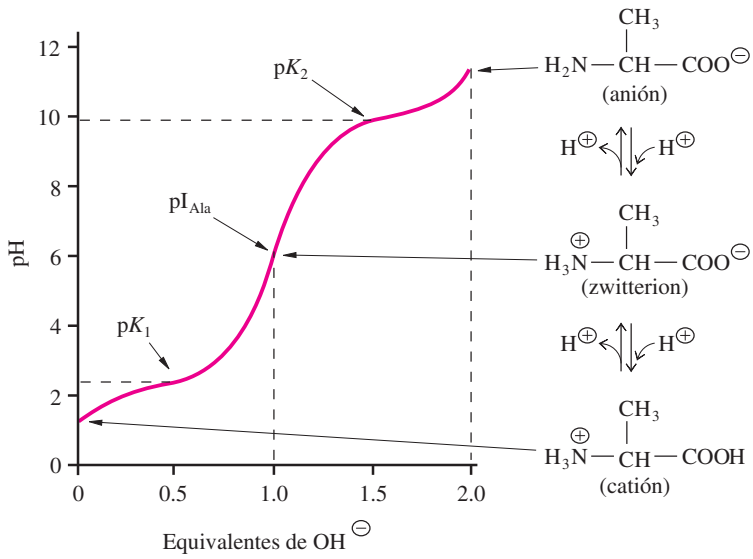
Los estados iónicos de las cadenas laterales de los aminoácidos influyen sobre las estructuras tridimensionales de las proteínas. Además, ya que varios residuos ionizables de aminoácido intervienen en catálisis por enzimas, la comprensión de las propiedades iónicas de los aminoácidos ayuda a comprender los mecanismos enzimáticos (capítulo 6).

Los valores de pK_a de los aminoácidos se determinan con curvas de titulación como las que se estudiaron en el capítulo anterior. En la figura 3.6 se muestra la titulación de la alanina. La alanina cuenta con dos grupos ionizables: el carboxilo α y el amino α, protonado. A medida que se agrega más base a la solución del ácido, la curva de titulación presenta dos valores de pK_a, a pH 2.4 y pH 9.9. Cada valor de pK_a se vincula con una zona de regulación donde el pH de la solución cambia relativamente poco al agregar más base.

El pK_a de un grupo ionizable corresponde a un punto medio en su curva de titulación. Es el pH al cual la concentración de la forma ácida (donador de protones) es exactamente igual a la concentración de su base conjugada (aceptor de protones). En el ejemplo de la figura 3.6, las concentraciones de la forma con carga positiva de la alanina y la del zwitterion son iguales cuando el pH es 2.4.

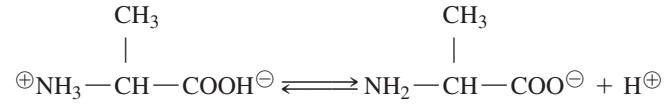


(3.1)



◀ Figura 3.6
Curva de titulación de la alanina. El primer valor de pK_a es 2.4; el segundo es 9.9. PI_{Ala} representa el punto isoeléctrico de la alanina.

A pH 9.9 la concentración del zwitterion es igual a la concentración de la forma con carga negativa.



(3.2)

Nótese que en el par ácido-base que hay en el primer equilibrio (reacción 3.1) el zwitterion es la base conjugada de la forma ácida de la alanina. En el segundo par ácido-base (reacción 3.2) el zwitterion es el donador de protón, o ácido conjugado, de la forma más básica que predomina a mayor pH.

Se puede deducir que la carga neta en las moléculas de alanina a pH 2.4 es +0.5, en promedio, y que la carga neta a pH 9.9 es –0.5. Entre los dos pH, 2.4 y 9.9, cuando el pH es 6.15, la carga neta promedio de las moléculas de alanina en solución es cero. Por esta razón, se dice que el pH 6.15 es el punto isoeléctrico (pI) o pH isoeléctrico de la alanina. Si la alanina se colocara dentro de un campo eléctrico a un pH inferior a su pI tendría una carga neta positiva (en otras palabras, predominaría su forma catiónica) y entonces migraría hacia el cátodo (el electrodo negativo). A un pH mayor que su pI, la alanina tendría una carga neta negativa y migraría hacia el ánodo (el electrodo positivo). En su punto isoeléctrico (pH = 6.15), la alanina no migraría en dirección alguna.

La histidina contiene una cadena lateral ionizable. La curva de titulación para la histidina contiene un punto más de inflexión que corresponde al pK_a de su cadena lateral (figura 3.7a, en la página siguiente). Como en el caso de la alanina, el primer pK_a (1.8) representa la ionización del COOH en posición α, y el valor más básico de pK_a (9.3) representa la ionización del grupo α-amino. El pK_a intermedio (6.0) corresponde a la desprotonación del ion imidazolio en la cadena lateral de la histidina (figura 3.7b). Al pH 7.0, la relación del imidazol (base conjugada) con el ion imidazolio (ácido conjugado) es 10:1. Así, las formas protonada y neutral de la cadena lateral de la histidina están presentes al mismo tiempo en concentraciones apreciables cerca del pH fisiológico. Una cadena lateral dada de histidina en una proteína puede estar protonada o no protonada, dependiendo de su ambiente inmediato dentro de la proteína. En otras palabras, el valor real de pK_a del grupo en la cadena lateral puede no ser igual que su valor para el aminoácido libre en solución. Esta propiedad determina que la cadena lateral de la histidina sea ideal para transferir protones dentro de los sitios catalíticos de las enzimas.

El punto isoeléctrico de un aminoácido que sólo contiene dos grupos ionizables (el grupo α-amino y el grupo α-carboxilo) es el promedio aritmético de sus dos valores de pK_a (es decir, $\text{pI} = (\text{p}K_1 + \text{p}K_2)/2$. Sin embargo, para un aminoácido que

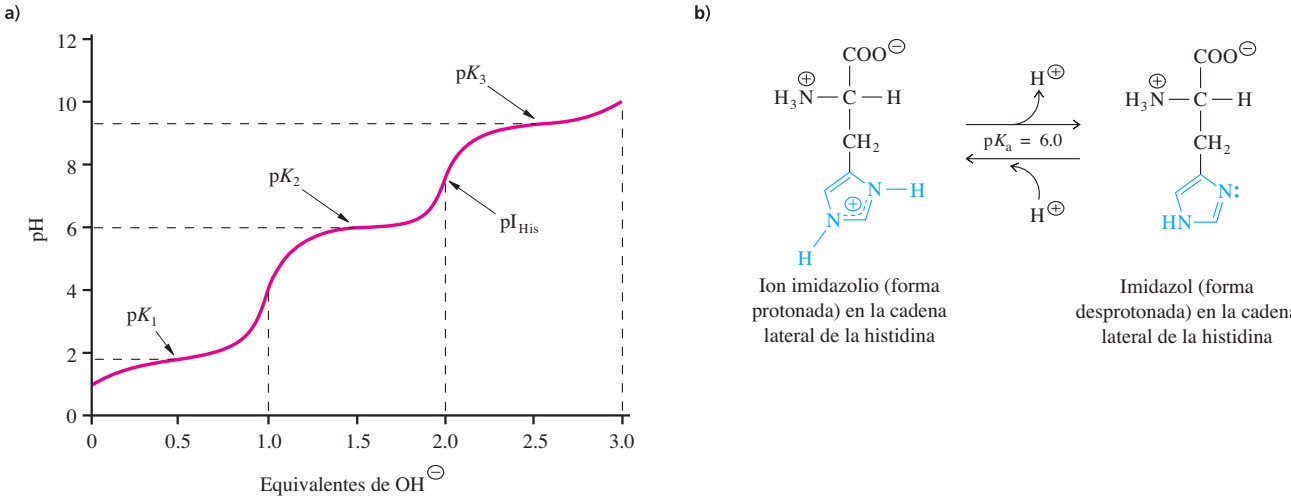


Figura 3.7 ▲
Ionización de la histidina. **a)** Curva de titulación de la histidina. Los tres valores de pK_a son 1.8, 6.0 y 9.3. pI_{His} representa el punto isoeléctrico de la histidina. **b)** Desprotonación del anillo de imidazolio en la cadena lateral de la histidina.

TABLA 3.2 Valores de pK_a de componentes ácidos y básicos de aminoácidos libres, a 25 °C.

Aminoácido	Valor de pK_a		
	Grupo carboxilo	Grupo amino	Cadena lateral
Glicina	2.4	9.8	
Alanina	2.4	9.9	
Valina	2.3	9.7	
Leucina	2.3	9.7	
Isoleucina	2.3	9.8	
Metionina	2.1	9.3	
Prolina	2.0	10.6	
Fenilalanina	2.2	9.3	
Triptófano	2.5	9.4	
Serina	2.2	9.2	
Treonina	2.1	9.1	
Cisteína	1.9	10.7	8.4
Tirosina	2.2	9.2	10.5
Asparagina	2.1	8.7	
Glutamina	2.2	9.1	
Ácido aspártico	2.0	9.9	3.9
Ácido glutámico	2.1	9.5	4.1
Lisina	2.2	9.1	10.5
Arginina	1.8	9.0	12.5
Histidina	1.8	9.3	6.0

contiene tres grupos ionizables, como la histidina, se debe evaluar la carga neta de cada especie iónica. El punto isoeléctrico de la histidina se halla entre los valores de pK_a a cada lado de la especie que no tiene carga neta; esto es, a medio camino entre 6.0 y 9.3, o sea 7.65.

Como se verifica en la tabla 3.2, los valores de pK_a de los grupos α-carboxilo en los aminoácidos libres van de 1.8 a 2.5. Esos valores son menores que los de los ácidos carboxílicos típicos, como el ácido acético (pK_a = 4.8), porque el vecino grupo $—NH_3^{\oplus}$ retira electrones del grupo ácido carboxílico, lo cual favorece la pérdida de un protón del grupo α-carboxilo. Las cadenas laterales, o grupos R, también afectan el valor de pK_a del grupo carboxilo α, y es la causa por la que distintos aminoácidos presentan diferentes valores de pK_a. (Se acaba de ver que los valores de histidina y alanina no son iguales).

El grupo α-COOH de un aminoácido es un ácido débil. Se puede usar la ecuación de Henderson-Hasselbalch (sección 2.9) para calcular la fracción del grupo que se ioniza a cualquier pH determinado.

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log\frac{[\text{aceptor de protón}]}{[\text{donador de protón}]} \qquad \textbf{(3.3)}$$

Para un aminoácido típico cuyo grupo α-COOH tiene un pK_a = 2.0, la relación del aceptor del protón (anión carboxilato) con el donador del protón (ácido carboxílico) a un pH = 7.0 se puede calcular por medio de la ecuación de Henderson-Hasselbalch.

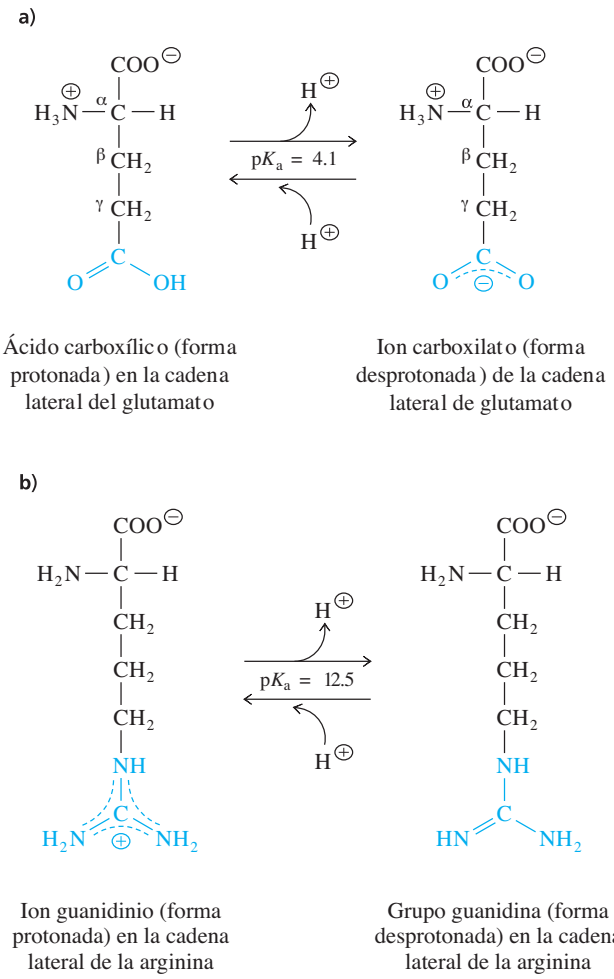
$$7.0 = 2.0 + \log\frac{[\text{RCOO}^{\ominus}]}{[\text{RCOOH}]} \qquad \textbf{(3.4)}$$

En este caso, la relación del anión carboxilato con el ácido carboxílico es de 100 000:1, lo que denota que bajo las condiciones imperantes de manera normal en el interior de una célula el anión carboxilato es la especie predominante.

El grupo α-amino de un aminoácido libre puede existir en forma de amina libre, $—NH_2$ (aceptor del protón), o como amina protonada, $—NH_3^{\oplus}$ (donador del protón). Los valores de pK_a van de 8.7 a 10.7, como se constata en la tabla 3.2. Para un aminoácido cuyo grupo amino α tiene un valor de pK_a de 10.0, la relación del aceptor

del protón con el donador del protón es 1:1000, cuando el pH es 7.0. En otras palabras, bajo condiciones fisiológicas, el grupo amino α está casi todo protonado y con carga positiva. Estos cálculos comprueban una afirmación anterior, que los aminoácidos libres existen principalmente en forma de zwitteriones a pH neutro. También muestran por qué es inadecuado dibujar la estructura de un aminoácido con los grupos — COOH y — NH_2 al mismo tiempo, ya que no hay pH al cual una cantidad apreciable de moléculas contienen un grupo carboxilo protonado y un grupo amino no protonado. Obsérvese que el grupo amino secundario de la prolina ($pK_a = 10.6$) también se protona a pH neutro, y la prolina, a pesar de la unión de la cadena lateral al grupo α-amino, también es zwitterion a pH 7.

Los siete aminoácidos estándar con grupos fácilmente ionizables en sus cadenas laterales son aspartato, glutamato, histidina, cisteína, tirosina, lisina y arginina. La ionización de esos grupos se apega a los mismos principios que la ionización de los grupos α-carboxilo y α-amino, y se puede aplicar la ecuación de Henderson-Hasselbalch a cada ionización. La ionización del grupo γ-carbonilo del glutamato ($pK_a = 4.1$) también se ve en la figura 3.8a. Nótese que el grupo γ-carboxilo está más alejado de la influencia del ion α-amonio y se comporta como un ácido débil con un $pK_a = 4.1$. Eso lo hace parecido en fuerza al ácido acético ($pK_a = 4.8$), mientras que el grupo α-carboxilo es un ácido más fuerte ($pK_a = 2.1$). La figura 3.8b muestra la desprotonación del grupo guanidinio de la cadena lateral en la arginina en una solución fuertemente básica. La deslocalización de carga estabiliza al ion guanidinio y contribuye a su alto valor de pK_a, de 12.5.



◀ Figura 3.8
Ionización de cadenas laterales en aminoácidos. **a)** Ionización del grupo γ-carboxilo protonado en el glutamato. La carga negativa del anión carboxilato está deslocalizada. **b)** Desprotonación del grupo guanidinio en la cadena lateral de la arginina. La carga positiva está deslocalizada.

Como ya se mencionó, los valores de pK_a de las cadenas laterales ionizables en las proteínas pueden ser distintos de los aminoácidos libres. Hay dos factores que causan esta perturbación de constantes de ionización. El primero es que los grupos α-amino y α-carboxilo pierden sus cargas una vez enlazados por uniones peptídicas en las proteínas; en consecuencia, ejercen efectos inductivos más débiles sobre sus cadenas laterales vecinas. El segundo es que la posición de una cadena lateral ionizable dentro de la estructura tridimensional de una proteína puede afectar su pK_a. Por ejemplo, la enzima ribonucleasa A tiene cuatro residuos de histidina, pero la cadena lateral de cada residuo tiene un pK_a ligeramente distinto como resultado de diferencias en sus entornos o microambientes inmediatos.

3.5 Unión de aminoácidos por enlaces peptídicos en las proteínas

La secuencia lineal de aminoácidos en una cadena polipeptídica se llama **estructura primaria** de una proteína. A los niveles más altos de estructura se les llaman estructura secundaria, terciaria y cuaternaria. La estructura de las proteínas se describirá con más detalle en el siguiente capítulo, pero es importante comprender los enlaces peptídicos y la estructura primaria antes de describir algunos de los temas restantes en este capítulo.

La estructura de los enlaces peptídicos se describe en la sección 4.3.

El enlace que se forma entre los aminoácidos es un enlace de amida y se llama **enlace peptídico**, o **enlace de péptido** (figura 3.9). Esta unión se puede concebir como el resultado de una condensación simple del grupo carboxilo α de un aminoácido con el grupo amino α del otro. Observe que se pierde una molécula de agua de los aminoácidos que se condensan en la reacción. (Recuérdese, de la sección 2.6, que esas reacciones sencillas de condensación son en extremo desfavorables en soluciones acuosas debido al gigantesco exceso de moléculas de agua. La ruta real de síntesis de proteína implica intermediarios reactivos que superan esta limitación). A diferencia de los grupos carboxilo y amino de los aminoácidos libres en solución, los grupos que intervienen en los enlaces peptídicos no tienen cargas iónicas.

La síntesis (traducción) de proteínas se describe en el capítulo 22.

Las mitades de aminoácido unidas en una cadena polipeptídica se llaman residuos de aminoácido. Los nombres de los residuos se forman sustituyendo la terminación *-ina* o *-ato* por *-ilo* (o *-il,* en nombres compuestos). Por ejemplo, un residuo de glicina en un polipéptido se llama glicilo y un residuo de glutamato se llama glutamilo. En los casos de asparagina, glutamina y cisteína, *-ilo* sustituye la *–a* final para formar asparaginilo, glutaminilo y cisteinilo, respectivamente. La terminación *ilo* indica que el residuo es una unidad de acilo (estructura que carece del hidroxilo del grupo carboxilo). El dipéptido de la figura 3.9 se llama alanilserina porque la alanina se convierte en una unidad de acilo, pero el aminoácido serina conserva su grupo carboxilo.

El grupo amino libre y el grupo carboxilo libre en los extremos opuestos de una cadena de péptido se llaman N-terminal (o terminal N, terminal amino) y C-terminal (o terminal C, terminal carboxilo), respectivamente. Por convención, los residuos de aminoácido en una cadena peptídica se numeran desde el N-terminal hasta el C-terminal y se suelen escribir de izquierda a derecha. Esta convención corresponde a la dirección de la síntesis de la proteína (sección 22.6). La síntesis comienza con el aminoácido N-ter-

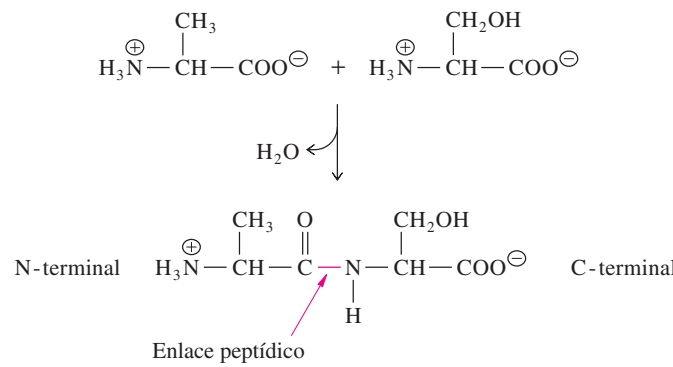


Figura 3.9 ▶
Enlace peptídico entre dos aminoácidos. La estructura del enlace peptídico se puede considerar como producto de una reacción de condensación donde el grupo α-carboxilo de un aminoácido se condensa con el grupo α-amino de otro aminoácido. El resultado es un dipéptido, en el que los aminoácidos están unidos por un enlace peptídico. En este caso se condensa alanina con serina, para formar alanilserina.

minal —que casi siempre es metionina (sección 22.5)— y prosigue en secuencia hacia el C-terminal, agregando uno por uno los residuos.

Para describir la secuencia de residuos de aminoácidos en péptidos y polipéptidos se usan tanto las abreviaturas normales de tres letras de los aminoácidos (por ejemplo Gly-Arg-Phe-Ala-Lys) como las abreviaturas de una letra (como GRFAK). Es importante conocer ambos sistemas de abreviatura. Los términos dipéptido, tripéptido, oligopéptido y polipéptido indican cadenas de dos, tres, varios (hasta unos 20) y muchos (por lo general más de 20) residuos de aminoácido, respectivamente. Un dipéptido contiene un enlace peptídico, un tripéptido contiene dos enlaces peptídicos, etc. Por regla general, cada cadena de péptido, sea cual fuere su longitud, posee un grupo α-amino libre y un grupo α-carboxilo libre. (Entre las excepciones están los residuos terminales modificados covalentemente y las cadenas circulares de péptido). Nótese que la formación de un enlace peptídico elimina a los grupos ionizables α-carboxilo y α-amino que hay en los aminoácidos libres.

La mayor parte de las cargas iónicas asociadas a una molécula de proteína se deben a las cadenas laterales de los aminoácidos componentes. Ello significa que la solubilidad y las propiedades iónicas de una proteína están determinadas en gran parte por su composición de aminoácidos. Además, las cadenas laterales de los residuos interaccionan y esas interacciones contribuyen a determinar la forma tridimensional y la estabilidad de una molécula de proteína (capítulo 4).

Algunos péptidos son compuestos biológicos importantes y la química de los péptidos es un campo activo de investigación. Varias hormonas son péptidos, por ejemplo, las endorfinas son moléculas naturales que modulan el dolor en los vertebrados. Algunos péptidos muy simples son útiles aditivos alimenticios, por ejemplo el aspartame, agente edulcorante, es el éster metílico de la aspartilfenilalanina (figura 3.10). El aspartame es unas 200 veces más dulce que el azúcar de mesa y se utiliza en forma extensa en bebidas dietéticas. También hay muchos péptidos que son toxinas, como los que forman parte del veneno de serpientes y de los hongos venenosos.

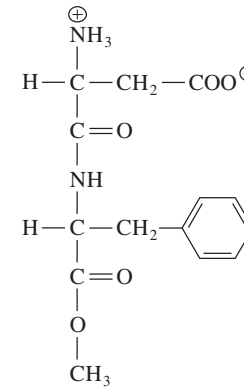


Figura 3.10 ▲
Aspartame (éster metílico de aspartilfenilalanina).

3.6 Técnicas de purificación de las proteínas

Para estudiar determinada proteína en el laboratorio, en general se debe separar de todos los demás componentes celulares, incluyendo a otras proteínas parecidas. Se pueden aplicar pocas técnicas analíticas en forma directa a las mezclas crudas de proteínas celulares porque contienen cientos (o miles) de proteínas diferentes. Los pasos de purificación son distintos para cada proteína. Se determinan probando con varias técnicas distintas hasta que se desarrolla un procedimiento que produce en forma repetida proteína altamente purificada y que conserva su actividad biológica. Los pasos de purificación suelen aprovechar pequeñas diferencias en las solubilidades, cargas netas, tamaños y especificidades de unión de las proteínas. En esta sección se describen algunos de los métodos comunes de purificación de proteínas. La mayor parte de las técnicas de purificación se lleva a cabo entre 0 y 4°C para minimizar los procesos dependientes de la temperatura, como la degradación y la desnaturalización (desdoblado) de la proteína.

El primer paso en la purificación de una proteína es preparar una solución de proteínas. La fuente de una proteína suele ser células enteras donde la proteína deseada constituye menos del 0.1% del peso total seco. El aislamiento de una proteína intracelular requiere suspender las células en una solución amortiguadora y homogeneizarlas o romperlas en fragmentos de célula. Bajo estas condiciones se disuelve la mayor parte de las proteínas. (Entre las excepciones principales están las proteínas de membrana, que requieren procedimientos especiales de purificación). Supóngase que la proteína que se pretende purificar es una entre varias que hay en la solución amortiguadora en estudio.

El siguiente paso de la purificación es, con frecuencia, una relativamente separación cruda, o **fraccionamiento**, procedimiento que aprovecha las distintas solubilidades de las proteínas en soluciones salinas. Con frecuencia se usa sulfato de amonio en esos fraccionamientos. Se mezcla suficiente sulfato de amonio con la solución de proteínas para precipitar a las impurezas menos solubles, que se eliminan por centrifugación. La proteína objetivo, y otras más, con mayor solubilidad, permanecen en el líquido que se llama fracción sobrenadante. A continuación se añade más sulfato de amonio a la fracción sobrenadante y se precipita la proteína que se desea. La mezcla se centrifuga, se separa el líquido y el precipitado se disuelve en un volumen mínimo de solución amortiguadora. En

el caso típico, el fraccionamiento con sulfato de amonio obtiene una purificación del doble al triple (es decir, de la mitad a dos terceras partes de las proteínas no deseadas se eliminan de la fracción que resulta, de proteína enriquecida). En este momento, el solvente que contiene sulfato de amonio residual se intercambia por diálisis por una solución amortiguadora adecuada para cromatografía. En la diálisis, se coloca una solución de la proteína en un cilindro de tubo de celofán sellado en un extremo. A continuación el tubo se sella en el otro extremo y se suspende dentro de un gran volumen de solución amortiguadora. La membrana de celofán es semipermeable: las proteínas de alto peso molecular son demasiado grandes para atravesar por los poros de la membrana, de manera que las proteínas permanecen dentro del tubo, mientras que los solutos de bajo peso molecular (incluyendo, en este caso, los iones de amonio y sulfato) se difunden y salen para ser reemplazados por los solutos de la solución amortiguadora.

A continuación se puede usar la **cromatografía en columna** para fraccionar la mezcla de proteínas que resta después de la precipitación con sulfato de amonio y la diálisis. Una columna cilíndrica se llena con un material insoluble, como fibras de celulosa sustituida o esferillas de material sintético. La mezcla de proteínas se agrega a la columna y se lava haciendo pasar por la matriz de material insoluble un solvente. A medida que el solvente fluye por la columna, el **eluido** (que es el líquido que sale por el fondo de la columna) se recolecta en muchas fracciones; en la figura 3.11a se muestran algunas de ellas. La velocidad con la que las proteínas atraviesan la matriz depende de las interacciones entre matriz y proteína. Para una columna dada, las distintas proteínas se eluyen a distintas velocidades. La concentración de proteína en cada fracción se puede determinar midiendo la absorbencia del eluido a 280 nm de longitud de onda (figura 3.11b). (Recuérdese que en la sección 3.2B se dijo que, a pH neutro, la tirosina y el triptófano absorben luz UV de 280 nm). Para localizar la proteína deseada, deben analizarse las fracciones obtenidas para determinar su actividad biológica, o alguna otra propiedad característica. La cromatografía en columna puede ser realizada bajo una presión alta,

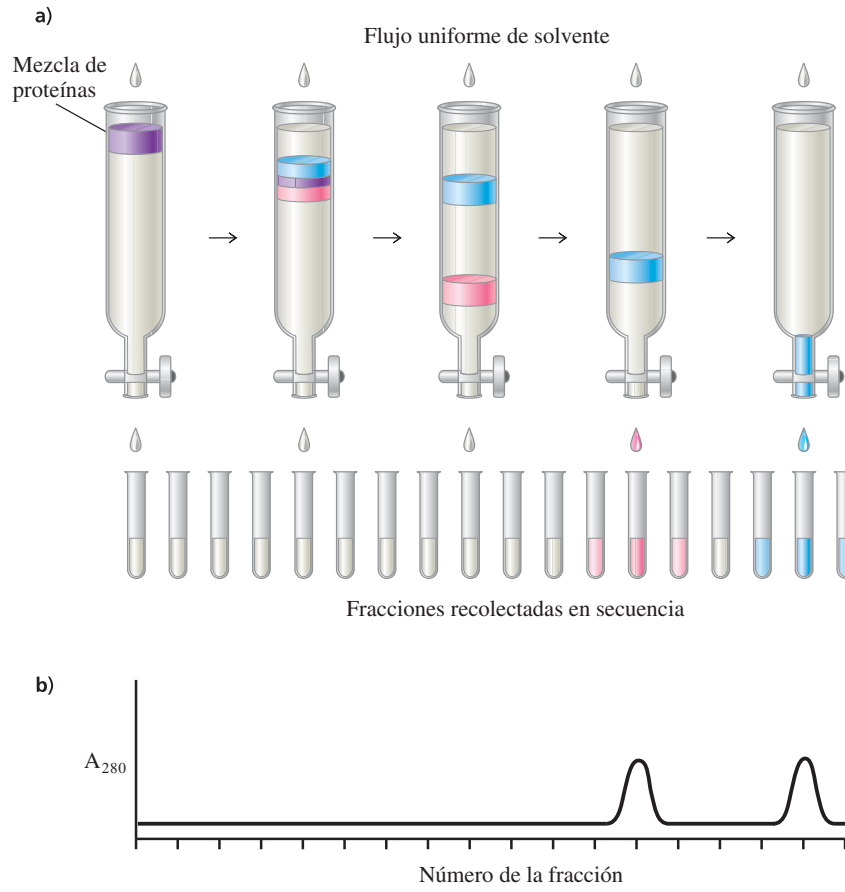


Figura 3.11 ▶
Cromatografía en columna. **a)** Se agrega una mezcla de proteínas a una columna que contiene una matriz sólida; entonces el solvente pasa por la columna desde un recipiente. El solvente lava las distintas proteínas (representadas por bandas roja y azul), que recorren la columna a distintas velocidades dependientes de sus interacciones con la matriz. El eluato se recolecta en una serie de fracciones, algunas de las cuales se muestran. **b)** Se determina la concentración de proteínas en cada fracción midiendo la absorbencia a 280 nm. Los picos corresponden a las bandas de elución de proteína en a). Entonces se analiza la proteína buscada en las fracciones. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

usando columnas pequeñas y densamente empacadas, con el flujo del solvente controlado por una computadora. A esta técnica se le llama cromatografía líquida de alto rendimiento o **HPLC** (de *high-performance liquid chromatography*).

Las técnicas cromatográficas se clasifican de acuerdo con el tipo de matriz. En la **cromatografía de intercambio iónico** la matriz tiene cargas positivas (resinas de intercambio de aniones) o cargas negativas (resinas de intercambio de cationes). Las matrices de intercambio aniónico se unen con proteínas con carga negativa y las retienen para su posterior elución. Por el contrario, los materiales de intercambio catiónico se enlazan con proteínas con carga positiva. Las proteínas enlazadas se pueden eluir en serie si se aumenta la concentración salina del solvente en forma gradual. A medida que aumenta la concentración de la sal, llega a una concentración en la que sus iones superan a las proteínas en la unión a la matriz. A esa concentración la proteína se libera y es recolectada en el eluido. Las proteínas unidas individualmente se eluyen a distintas concentraciones de sal, y este fraccionamiento determina que la cromatografía de intercambio iónico constituya un método poderoso para purificar proteínas.

La **cromatografía por filtración en gel** separa a las proteínas con base en su tamaño molecular. El gel es una matriz de esferillas porosas. Las proteínas que son menores que el tamaño promedio del poro penetran en gran parte del volumen interno de las perlas, y de ese modo se retardan por la matriz cuando la solución amortiguadora fluye por la columna. Mientras menor sea la proteína, se eluye con más retraso de la columna. Hay menos poros accesibles a las moléculas mayores de proteína. En consecuencia, las proteínas más grandes rodean a las perlas y se eluyen primero.

La **cromatografía de afinidad** es el tipo de cromatografía en columna más selectivo. Se basa en interacciones específicas de unión entre la proteína deseada y alguna otra molécula enlazada en forma covalente a la matriz de la columna. La molécula unida a la matriz puede ser una sustancia o ligando que se une a una proteína *in vivo*; un anticuerpo que reconozca a la proteína deseada u otra proteína de la cual se conozca el modo de interacción con la proteína deseada dentro de la célula. A medida que la mezcla de proteínas pasa por la columna, sólo la proteína deseada se une en forma específica a la matriz. A continuación la columna se lava varias veces con solución amortiguadora para deshacerse de las proteínas adheridas en forma inespecífica. Por último, la proteína deseada puede eluirse lavando la columna con un solvente con alta concentración de sal, que rompa la interacción entre la proteína y la matriz de la columna. En algunos casos se puede extraer la proteína ligada en forma selectiva de la columna de afinidad agregando un exceso de ligando al amortiguador de elución. La proteína deseada se une preferencialmente al ligando en la solución y no a la menor concentración de ligando que está unido a la matriz insoluble en la columna. Este método es más efectivo cuando el ligando es una molécula pequeña. La cromatografía de afinidad puede, por sí misma, purificar en ocasiones una proteína de 1000 a 10,000 veces.

3.7 Técnicas analíticas

La electroforesis separa proteínas de acuerdo con su migración en un campo eléctrico. En la **electroforesis en gel de poliacrilamida** (**PAGE**, de *polyacrylamide gel electrophoresis*) las muestras de proteína se colocan en una matriz de gel de poliacrilamida con muchos enlaces cruzados y se aplica un campo eléctrico. La acidez de la matriz se regula a un pH moderadamente alcalino, de tal modo que la mayor parte de las proteínas, que es aniónica, migra hacia el ánodo. En el caso típico se corren varias muestras al mismo tiempo junto con una muestra de referencia. La matriz de gel retarda la migración de moléculas grandes, al moverse en el campo eléctrico. Por consiguiente, las proteínas se fraccionan con base tanto en su carga como en su masa.

En una modificación de la técnica normal de electroforesis se usa el dodecilsulfato de sodio (SDS, de *sodium dodecylsulfate*), un detergente con carga negativa, para ocultar la carga natural de las proteínas, y poderlas separar con base sólo en su masa. La electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) se usa para evaluar la pureza y estimar el peso atómico de una proteína. En la SDS-PAGE, el detergente se agrega al gel de poliacrilamida y también a las muestras de proteína. Se añade asimismo un agente reductor para reducir todos los puentes disulfuro que haya. El anión dodecilsulfato, que tiene una larga cola hidrofóbica ($CH_3(CH_2)_{11}OSO_3^{\ominus}$, figura 2.8) se une a las cadenas laterales hidrofóbicas de los residuos de aminoácido en la cadena de polipéptido. El SDS se

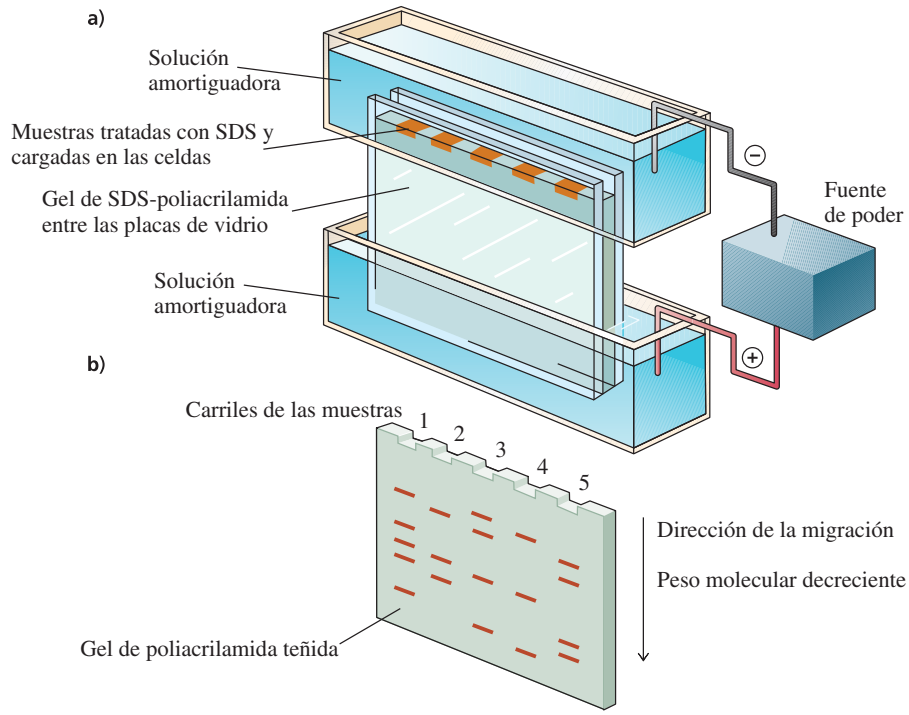


Figura 3.12 ▶
SDS-PAGE. **a)** Un aparato de electroforesis tiene un gel de SDS-poliacrilamida entre dos placas de vidrio y solución amortiguadora en los depósitos superior e inferior. Las muestras se cargan en las celdas del gel y se aplica voltaje. Como las proteínas acomplejadas con SDS tienen carga negativa migran hacia el ánodo. **b)** Después de la electroforesis, la figura de bandas debida a las proteínas se puede visualizar por tinción. Como las proteínas más pequeñas migran a mayor velocidad se hallan en la parte inferior del gel.

enlaza en una relación de aproximadamente una molécula por cada dos residuos de proteína típica. Como las proteínas mayores se unen con más SDS, en forma proporcional, las relaciones de carga a masa de todas las proteínas tratadas son aproximadamente iguales. Todos los complejos de SDS-proteína presentan mucha carga negativa y se mueven hacia el ánodo, como se representa en la figura 3.12a. Sin embargo, su velocidad de migración a través del gel es inversamente proporcional al logaritmo de su masa —las proteínas mayores encuentran más resistencia y por consiguiente migran con más lentitud que las proteínas menores. Este efecto de criba difiere de la cromatografía de filtración en gel porque en ésta las moléculas mayores se excluyen de los poros del gel y en consecuencia transitan con más rapidez. En la SDS-PAGE, todas las moléculas penetran en los poros del gel y las proteínas más grandes se mueven con más lentitud. Las bandas de proteína que resultan de esa migración diferencial (figura 3.13) se pueden visualizar tiñéndolas. Se pueden estimar los pesos moleculares de las proteínas desconocidas comparando su migración con la de proteínas de referencia en el mismo gel.

Aunque la SDS-PAGE es un método analítico ante todo, se puede adaptar para purificar proteínas. Las proteínas desnaturalizadas se pueden recuperar de la SDS-PAGE cortando y separando las bandas de un gel. A continuación se electroeluye la proteína aplicando una corriente eléctrica que permite que la proteína migre hacia una solución amortiguadora. Después de concentrar y eliminar sales, esas preparaciones de proteína se pueden usar en análisis estructural, preparación de anticuerpos u otras finalidades.

La **espectrometría de masas**, como indica el nombre, es una técnica que determina la masa de una molécula. El tipo más sencillo de espectrómetro de masas mide el tiempo que tarda una molécula cargada, en fase gaseosa, para trasladarse desde su punto de inyección hasta un detector sensible. Ese tiempo depende de la carga de una molécula y de su masa, y el resultado se maneja como relación de masa/carga. Se ha usado la técnica en química, durante casi cien años, pero su aplicación a las proteínas era limitada porque sólo en fecha reciente fue posible dispersar moléculas cargadas de proteína en una corriente de partículas gaseosas.

El problema fue resuelto a finales de la década de 1980, con el desarrollo de dos nuevos tipos de espectrómetros de masas. En la **espectrometría de masas por electroaspersión**, la solución de proteína se bombea a través de una aguja metálica, a alto voltaje, para crear diminutas gotitas. El líquido se evapora con rapidez en un vacío y las proteínas cargadas se enfocan hacia un detector mediante un campo magnético. La segunda

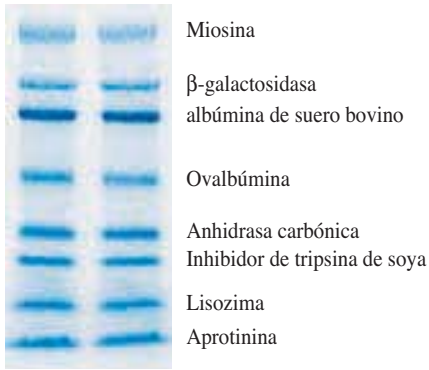
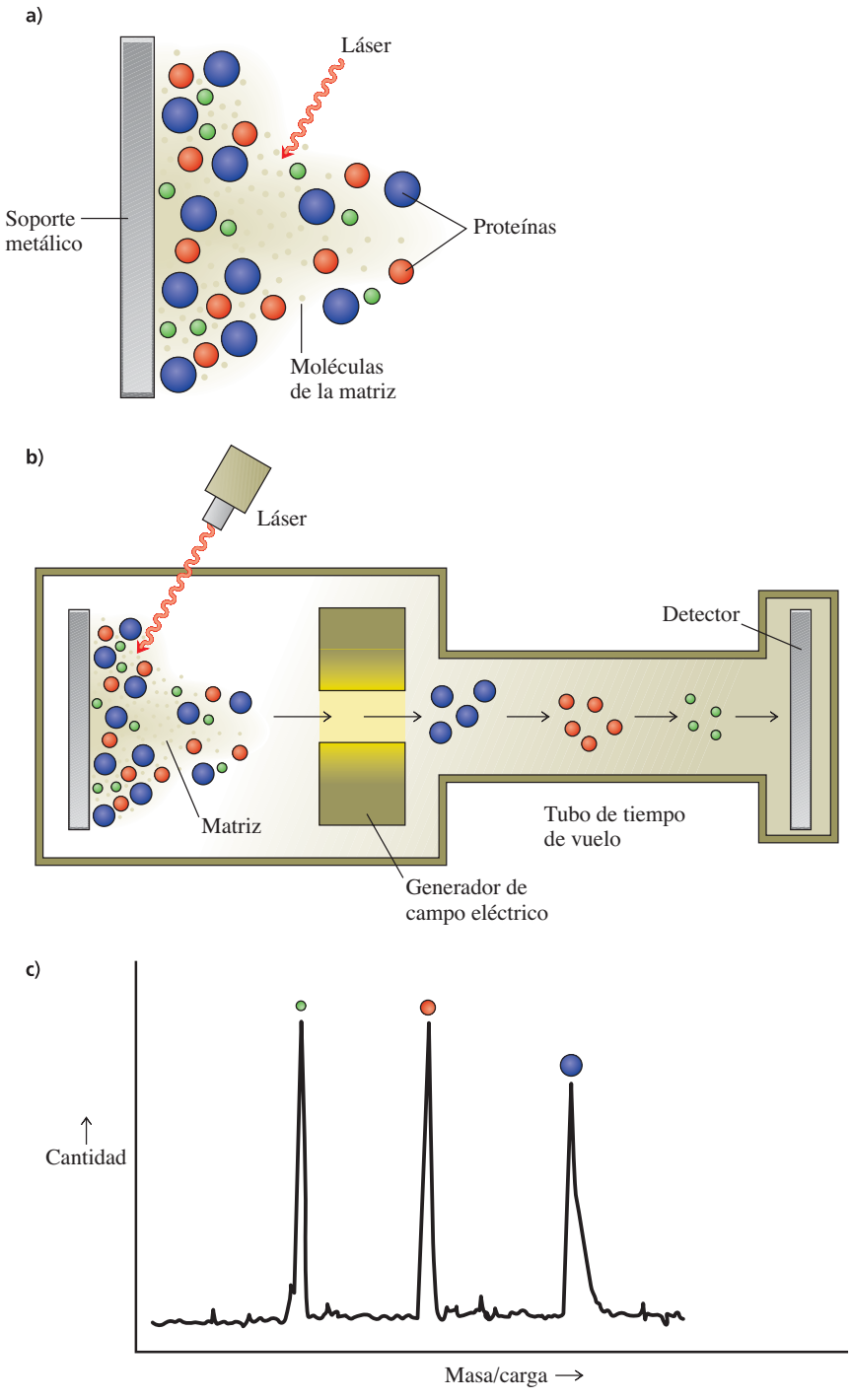


Figura 3.13 ▲
Proteínas teñidas, separadas en un gel de SDS-poliacrilamida.

de las nuevas técnicas se llama **ionizacion por desorción asistida por matriz (MALDI**, de *matriz-assisted desorption ionization*). En este método la proteína se mezcla con una matriz química y la mezcla se precipita en un sustrato metálico. La matriz es una molécula orgánica pequeña que absorbe luz a determinada longitud de onda. Un impulso de luz láser con la longitud de onda de absorción imparte energía a las moléculas de proteína, a través de la matriz. En un instante las proteínas se liberan del sustrato y se dirigen hacia el detector (figura 3.14). Cuando se mide el tiempo de vuelo (TOF, de *time of flight*), la técnica se llama MALDI-TOF.



◀ Figura 3.14
Espectrometría de masas MALDI-TOF. **a)** Un destello de luz libera las proteínas de la matriz. **b)** Las proteínas con carga eléctrica se dirigen hacia el detector mediante un campo eléctrico. **c)** El tiempo de llegada al detector depende de la masa y la carga de la proteína.

Los datos brutos de un experimento de espectrometría de masas pueden ser bastante simples, como se ve en la figura 3.14. Allí se detecta una sola especie con una carga positiva, por lo que la relación de masa/carga indica la masa en forma directa. En otros casos los espectros pueden ser más complicados, en especial en la espectrometría de masas con electroaspersión. Con frecuencia hay varias especies con cargas diferentes y se debe calcular la masa correcta analizando una colección de moléculas con cargas de +1, +2, +3, etcétera. El espectro puede ser amilanador cuando la fuente es una mezcla de distintas proteínas. Por fortuna hay programas complicados de cómputo que pueden analizar los datos y calcular las masas correctas. La popularidad actual de la espectrometría de masas debe tanto al desarrollo de estos programas como a los nuevos componentes ("*hardware*") y los nuevos métodos de preparación de muestras.

La espectrometría de masas es muy sensible y muy exacta. Con frecuencia se puede obtener la masa de una proteína con cantidades del orden de picomoles, que se aíslan de un gel de SDS-PAGE. Se puede detectar la masa correcta con una exactitud menor que la masa de un solo protón.

3.8 Composición en aminoácidos de las proteínas

Una vez aislada una proteína, se puede determinar su composición en aminoácidos. Primero se rompen los enlaces peptídicos de la proteína por hidrólisis ácida, en el caso típico con HCl 6 M (figura 3.15). A continuación, la mezcla hidrolizada, o hidrolizado, se somete a un procedimiento cromatográfico en el que cada uno de los aminoácidos se separa y se cuantifica en un proceso que se designa **análisis de aminoácidos.** Un método de análisis de aminoácidos consiste en tratar el hidrolizado de proteína con fenilisotiocianato (PITC, de *phenyl isothiocyanate*) a un pH de 9.0 para generar derivados de feniltiocarbamoílo (PTC)-aminoácido (figura 3.16). La mezcla de PTC-aminoácido se somete entonces a HPLC en una columna de esferillas de sílice a la que se fijan cadenas cortas de hidrocarburo. Los aminoácidos se separan por las propiedades hidrofóbicas de sus cadenas laterales. Cuando cada derivado de PTC-aminoácido se eluye, su concentración se detecta y determina midiendo la absorbencia del eluato a 254 nm (la absorbencia pico de la mitad de PTC). En la figura 3.17 se aprecia una gráfica de la absorbencia del eluato en función del tiempo. Cada pico corresponde a determinado PTC-aminoácido que representa un residuo presente en la proteína original. Ya que los distintos derivados de PTC-aminoácidos se eluyen a velocidades distintas, el tiempo en el que un derivado de aminoácido se eluye de la columna identifica al aminoácido en relación con estándares conocidos. La cantidad de cada aminoácido en el hidrolizado es proporcional al área bajo su pico. Con este método se puede efectuar un análisis de aminoácidos en muestras tan pequeñas como de 1 picomol (10^{-12} mol) de una proteína que contenga unos 200 residuos.

A pesar de su utilidad, la hidrólisis ácida no puede producir un análisis completo de proteínas. Como las cadenas laterales de la asparagina y la glutamina contienen enlaces de amida, el ácido que se usa para romper los enlaces peptídicos de la proteína también convierte a la asparagina en ácido aspártico y a la glutamina en ácido glutámico. Cuando se usa la hidrólisis ácida, al total de glutamato y glutamina combinados, se le representa por la abreviatura Glx o Z, y al total de aspartato y asparagina se le representa por Asx o B, como en el cromatograma de la figura 3.17. Otras limitaciones de la hidrólisis ácida son pequeñas pérdidas de serina, treonina y tirosina. Además, la cadena lateral del triptófano casi se destruye por completo con la hidrólisis ácida.

Se han determinado las composiciones completas en aminoácidos de muchas proteínas usando diversas técnicas analíticas. Se han encontrado grandes diferencias de composición que ilustran el tremendo potencial de diversidad con base en distintas combinaciones de los 20 aminoácidos. La composición en aminoácidos (y su secuencia) en las proteínas también se puede determinar a partir de la secuencia de su gen. De hecho, hoy es mucho más fácil clonar y secuenciar ADN que purificar y secuenciar una proteína. La tabla 3.3 muestra la frecuencia promedio de residuos de aminoácidos en más de 1000 proteínas diferentes cuyas secuencias están depositadas en bases de datos

TABLA 3.3 Composición en aminoácidos de las proteínas

Aminoácido	Frecuencia en proteínas (%)
Muy hidrofóbico	
Ile (I)	5.2
Val (V)	6.6
Leu (L)	9.0
Phe (F)	3.9
Met (M)	2.4
Menos hidrofóbico	
Ala (A)	8.3
Gly (G)	7.2
Cys (C)	1.7
Trp (W)	1.3
Tyr (Y)	3.2
Pro (P)	5.1
Thr (T)	5.8
Ser (S)	6.9
Muy hidrofílico	
Asn (N)	4.4
Gln (Q)	4.0
Ácido	
Asp (D)	5.3
Glu (E)	6.2
Básico	
His (H)	2.2
Lys (K)	5.7
Arg (R)	5.7

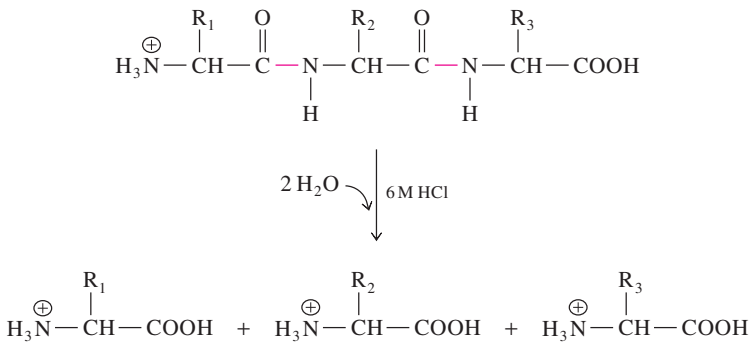


Figura 3.15 ▲
Hidrólisis de un péptido catalizada por ácido. La incubación con HCl 6 M a 110°C durante 16 a 72 horas libera los aminoácidos componentes de un péptido.

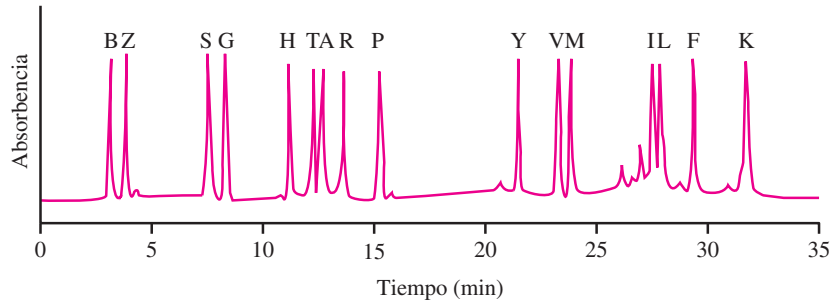


Figura 3.17 ▲
Cromatograma obtenido en la separación de PTC-aminoácidos por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Los PTC-aminoácidos en el eluato de la columna se detectan por su absorción a 254 nm. Los picos se identifican con abreviaturas de una letra. Las letras B y Z indican totales de asparagina + aspartato y de glutamina + glutamato, respectivamente. [Adaptado de Hunkapiller, M. W., Strickler, J. E., y Wilson, K. J. (1984). Contemporary methodology for protein structure determination. *Science* 226:304-311].

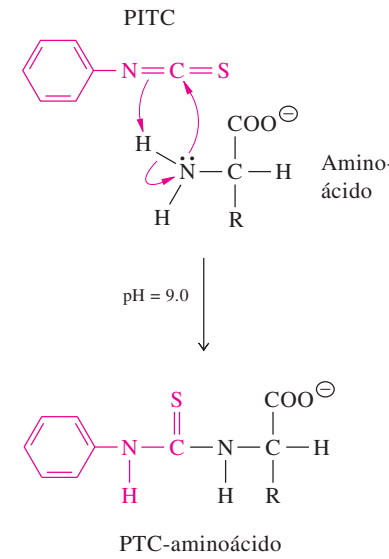


Figura 3.16 ▲
Aminoácido tratado con fenilisotiocianato (PITC). El grupo α-amino de un aminoácido reacciona con el fenilisotiocianato para formar feniltiocarbamoíl-aminoácido (PTC-aminoácido).

de proteínas. Los aminoácidos más comunes son leucina, alanina y glicina, y les siguen serina, valina y glutamato. El triptófano, la cisteína y la histidina son los aminoácidos menos abundantes en las proteínas típicas.

3.9 Determinación de la secuencia de los residuos de aminoácido

El análisis de aminoácidos produce información sobre la composición de una proteína, pero no acerca de su estructura primaria (o secuencia de residuos). Pehr Edman desarrolló, en 1950, una técnica que permite extraer e identificar uno por uno los residuos del N-terminal de una proteína. El **procedimiento de degradación de Edman** consiste en tratar una proteína a pH 9.0 con PITC, que también se conoce como reactivo de Edman. (Recuérdese que también se puede usar PITC en la medida de los aminoácidos libres, como se ve en la figura 3.16). El PITC reacciona con el N-terminal libre de la cadena para formar un derivado de feniltiocarbamoílo, o PTC-péptido (figura 3.18, en la página siguiente). Cuando el derivado de PTC-péptido se trata con un ácido anhidro, como ácido trifluoroacético, el enlace peptídico del residuo N-terminal se rompe en forma selectiva y libera un derivado de anilinotiazolinona del residuo. Este derivado se

▲ Pehr Edman (1916-1977) desarrolló una técnica para secuenciar polipéptidos.

puede extraer con un solvente orgánico como el cloruro de butilo y deja el péptido remanente en la fase acuosa. El derivado inestable de anilinotiazolinona se trata entonces con ácido acuoso, que lo convierte en un derivado estable de feniltiohidantoína del aminoácido que constituía el residuo N-terminal (PTH-aminoácido). La cadena peptídica en fase acuosa, ahora un residuo más corto (el residuo 2 de la proteína es ahora el N-terminal), se puede ajustar regresando al pH 9.0 y tratándolo de nuevo con PITC. Todo el procedimiento se puede repetir en serie, usando un instrumento automático llamado secuenciador. Cada ciclo produce un PTH-aminoácido que se puede identificar cromatográficamente, por lo general mediante HPLC.

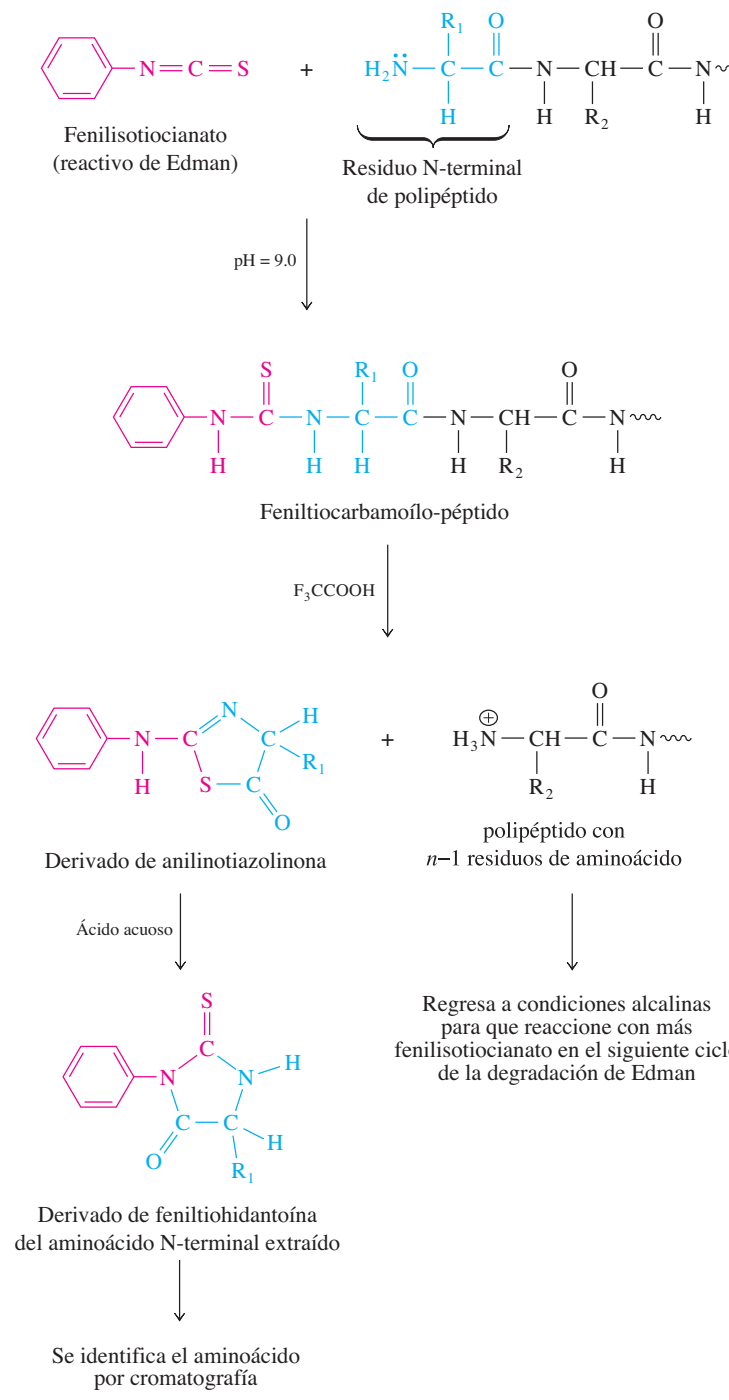


Figura 3.18 ▶
Procedimiento de degradación de Edman. El residuo N-terminal de una cadena polipeptídica reacciona con fenilisotiocianato y forma un feniltiocarbamoíl-péptido. Al tratar este derivado con ácido trifluoroacético (F_3CCOOH) se libera un derivado de anilinotiazolinona del residuo de aminoácido N-terminal. La anilinotiazolinona se extrae y trata con ácido acuoso, con lo que el derivado se reordena y forma un derivado estable de feniltiohidantoína, que entonces se puede identificar por cromatografía. El resto de la cadena polipeptídica, cuyo nuevo residuo N-terminal se encontraba en el paso previo en la segunda posición, se sujeta al siguiente ciclo de degradación de Edman.

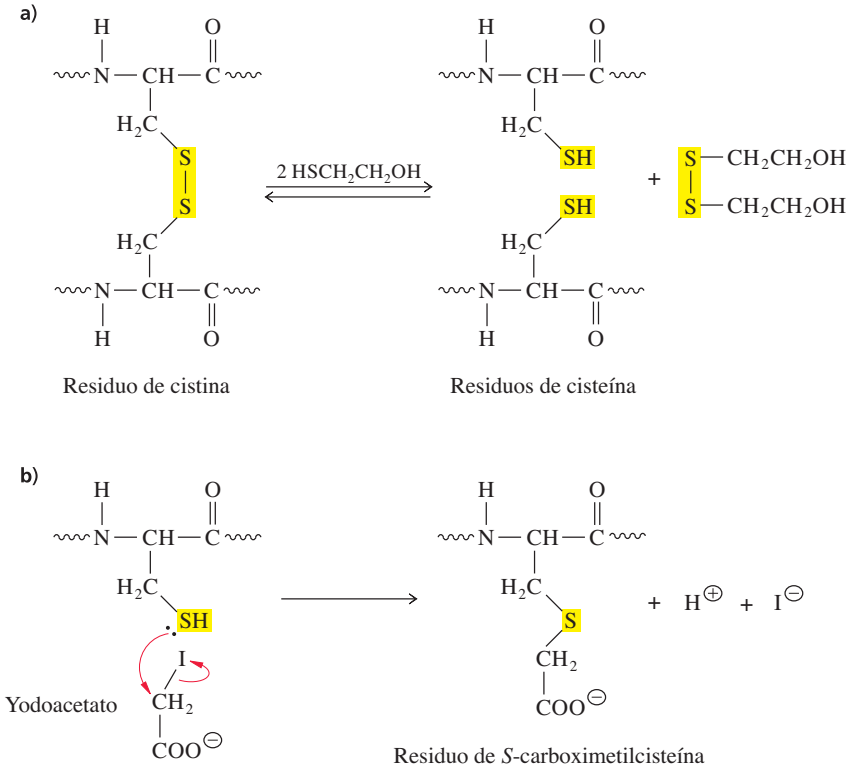


Figura 3.19 ▲
Rompimiento y bloqueo de enlaces disulfuro. **a)** Cuando se trata una proteína con 2-mercaptoetanol ($HSCH_2C_2OH$) en exceso, se produce una reacción de intercambio de disulfuro donde cada residuo de cistina se reduce a dos residuos de cisteína y el 2-mercaptoetanol se oxida formando un disulfuro. **b)** Al tratar la proteína reducida con yodoacetato, un agente alquilante, todos los residuos sin cisteína se convierten en residuos de S-carboximetilcisteína estables, evitando así la reformación de enlaces de disulfuro en presencia de oxígeno.

Cuando una proteína contiene uno o más residuos de cistina se deben romper los puentes disulfuro para permitir la liberación de los residuos de cisteína como PTH-aminoácidos, durante los ciclos adecuados de la degradación de Edman. Los compuestos tioles, como el 2-mercaptoetanol, se usan con frecuencia para escindir los puentes disulfuro. Los tioles reducen los residuos de cistina a pares de residuos de cisteína (figura 3.19a). Los grupos sulfhidrilo reactivos de los residuos de cisteína se bloquean entonces, por tratamiento con un agente alquilante como yodoacetato, que convierte los residuos de cisteína oxidables en residuos estables de *S*-carboximetilcisteína, y así se evita la reformación de puentes de disulfuro en presencia de oxígeno (figura 3.19b).

El rendimiento del procedimiento de la degradación de Edman bajo condiciones cuidadosamente controladas se acerca al 100%, y unos pocos picomoles de la proteína de muestra pueden producir secuencias de 30 residuos o más antes de que la concentración creciente de muestra no recuperada en los ciclos anteriores del procedimiento haga confusa la medición. Por ejemplo, si el procedimiento de degradación de Edman tuviera una eficiencia del 98%, el rendimiento acumulado al ciclo número 30 sería $0.98^{30} = 0.55$. En otras palabras, sólo aproximadamente la mitad de los PTH-aminoácidos generados en el 30° ciclo se derivarían del 30° residuo del N-terminal.

3.10 Estrategias de secuenciación de proteínas

La mayor parte de las proteínas contiene demasiados residuos para poder secuenciarse por completo con el proceso de degradación de Edman sólo a partir del N-terminal. Por

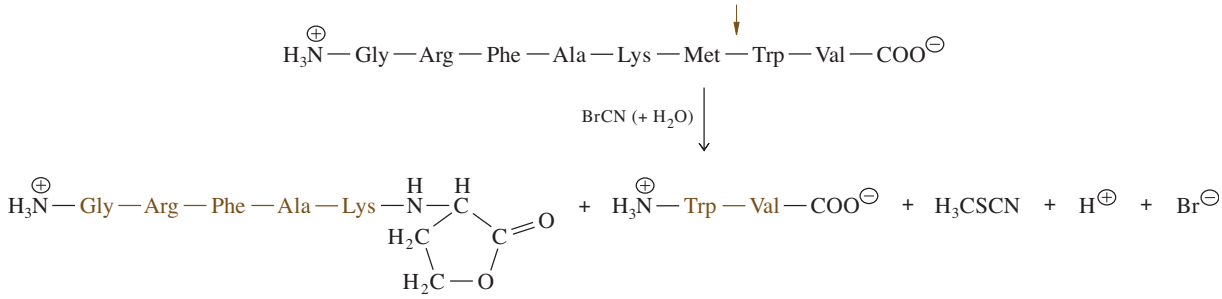
consiguiente, se usan enzimas denominadas proteasas que catalizan selectivamente la hidrólisis de los enlaces peptídicos en las proteínas, o ciertos reactivos químicos para romper en forma selectiva algunos de los enlaces peptídicos de una proteína. Los péptidos menores que se forman se aíslan y se someten a la secuenciación por el procedimiento de degradación de Edman.

El bromuro de cianógeno (BrCN) es un reactivo químico que reacciona en forma específica con residuos de metionina y produce péptidos con residuos C-terminales de homoserina lactona y nuevos residuos N-terminales (figura 3.20). Como la mayor parte de las proteínas contiene relativamente pocos residuos de metionina, el tratamiento con BrCN suele producir sólo unos pocos fragmentos de péptido. Por ejemplo, la reacción de BrCN con una cadena polipeptídica que contenga tres residuos internos de metionina debe generar cuatro péptidos. Cada fragmento se puede secuenciar entonces a partir de su N-terminal.

Se pueden usar muchas proteasas distintas para generar fragmentos y secuenciar una proteína. Por ejemplo, la tripsina cataliza en forma específica la hidrólisis de enlaces peptídicos en el lado carbonílico de los residuos de lisina y arginina, y los dos tienen cadenas laterales con carga positiva (figura 3.21a). La proteasa V8 de *Staphylococcus aureus* cataliza la ruptura de enlaces peptídicos en el lado carbonílico de residuos con carga negativa (glutamato y aspartato), y bajo condiciones adecuadas (bicarbonato de amonio 50 mM) sólo rompe las uniones glutamilo. La quimotripsina es una proteasa menos específica que cataliza de preferencia la hidrólisis de enlaces peptídicos en el lado carbonílico de residuos sin carga con cadenas laterales aromáticas o hidrofóbicas voluminosas, como fenilalanina, tirosina y triptófano (figura 3.21b).

Con una aplicación adecuada de bromuro de cianógeno, tripsina, proteasa V8 de *S. aureus* y quimotripsina a muestras individuales de una proteína grande se pueden generar numerosos fragmentos peptídicos de diversos tamaños. Esos fragmentos pueden separarse entonces y secuenciarse por degradación de Edman. En la etapa final de la determinación de la secuencia se puede deducir la secuencia de aminoácidos de una cadena grande de polipéptido alineando las secuencias iguales de fragmentos de péptido que se traslapen, como se ilustra en la figura 3.21c. Cuando se refiere a un residuo de aminoácido cuya posición en la secuencia se conoce, se acostumbra adjuntar su número en la secuencia a la abreviatura del residuo. Por ejemplo, el tercer residuo del péptido que muestra la figura 3.21 se llama Ala-3.

El proceso de generar y secuenciar fragmentos de péptido tiene especial importancia para obtener información acerca de las secuencias de proteínas cuyos N-terminales están bloqueados. Por ejemplo, el grupo α-amino N-terminal de muchas proteínas bacterianas se formila y no reacciona en absoluto cuando se somete al procedimiento de degradación de Edman. Los fragmentos peptídicos con N-terminales libres se pueden obtener por escisión selectiva, para entonces separarlos y secuenciarlos de modo que al menos se pueda obtener algo de la secuencia interna de la proteína.



Peptidilhomoserina lactona

Figura 3.20 ▲
Escisión de proteína mediante bromuro de cianógeno (BrCN). El bromuro de cianógeno rompe las cadenas de polipéptido en el lado C-terminal de los residuos de metionina. La reacción produce una peptidilhomoserina lactona y genera un nuevo N-terminal.

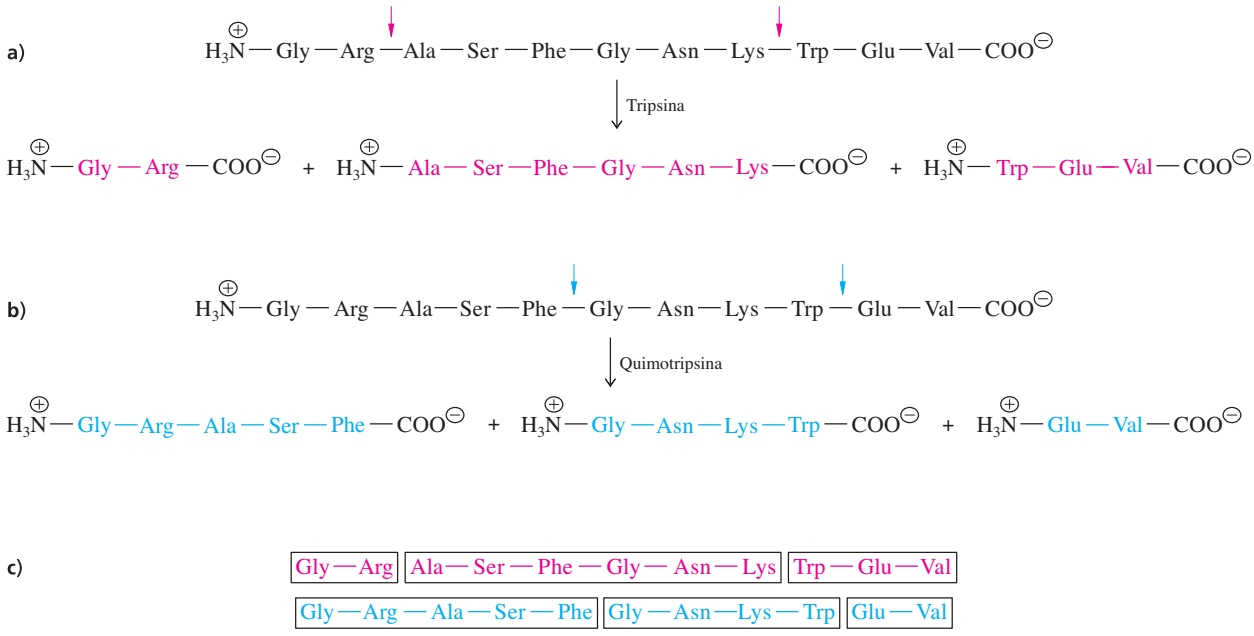


Figura 3.21 ▲
Escisión y secuenciación de un oligopéptido. **a)** Con tripsina se cataliza el rompimiento de péptidos en el lado carbonílico de los residuos básicos arginina y lisina. **b)** Con quimotripsina se cataliza el rompimiento de péptidos en el lado carbonílico de residuos sin carga, con cadenas laterales aromáticas o hidrofóbicas voluminosas, como fenilalanina, tirosina y triptófano. **c)** Mediante el procedimiento de degradación de Edman se determina la secuencia de cada fragmento (indicado en los cuadros) y entonces alineando las secuencias iguales de fragmentos que se traslapan se puede determinar el orden de los fragmentos y con ello deducir la secuencia de todo el oligopéptido.

Para proteínas que contienen puentes disulfuro, no se resuelve la estructura covalente completa sino hasta que se hayan establecido las posiciones de los enlaces disulfuro. Las posiciones de los enlaces cruzados disulfuro puede determinarse fragmentando la proteína intacta, aislando los fragmentos peptídicos y determinando cuáles fragmentos contienen residuos de cistina. La tarea de determinar las posiciones de los enlaces cruzados se vuelve bastante complicada cuando la proteína contiene varios puentes de disulfuro.

La deducción de la secuencia de aminoácidos de determinada proteína a partir de la secuencia de su gen (figura 3.22 en la siguiente página) resuelve algunas de las limitaciones de las técnicas analíticas. Por ejemplo, se puede determinar la cantidad de residuos de triptófano y aspartato y se diferencian los residuos de asparagina ya que son distintos codones los que los codifican. Sin embargo, la secuenciación directa de proteínas todavía tiene importancia porque es la única forma de determinar si hay aminoácidos modificados o si los residuos de aminoácido se han eliminado después de terminar la síntesis de la proteína.

En 1953, Frederick Sanger determinó por primera vez la secuencia de una proteína (insulina). Se le otorgó el Premio Nobel 1956 por este trabajo. Veinticuatro años después, Sanger ganó un segundo Premio Nobel por ser precursor en la secuenciación de ácidos nucleicos. Hoy se conoce las secuencias de aminoácidos de miles de proteínas distintas. Estas secuencias revelan no sólo los detalles de la estructura de las proteínas individuales, sino que también permiten que los investigadores identifiquen las familias de proteínas relacionadas y anticipen la estructura tridimensional y a veces la función de las proteínas recién descubiertas.

▲ Frederick Sanger (1918–) Obtuvo el Premio Nobel de Química en 1956 por sus trabajos sobre secuenciación de proteínas. Recibió un segundo Premio Nobel de Química en 1980 por desarrollar métodos para secuenciar ADN.

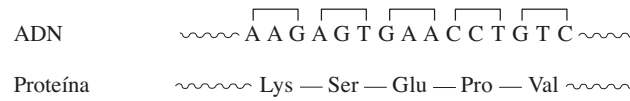


Figura 3.22 ▶
Secuencias de ADN y proteína. La secuencia de aminoácidos en una proteína se puede deducir por la secuencia de nucleótidos en el gen correspondiente. Una secuencia de tres nucleótidos especifica un aminoácido. A, C, G y T representan los residuos de nucleótidos en el ADN.

3.11 Relaciones evolutivas a partir de comparaciones de las estructuras primarias de las proteínas

En muchos casos se ha secuenciado la misma proteína a partir de diversas especies. Los resultados indican que las especies con relación cercana contienen proteínas con secuencias muy parecidas de aminoácidos y que las proteínas de especies con relación lejana se parecen mucho menos en su secuencia. Las diferencias reflejan el cambio evolutivo a partir de una secuencia ancestral común de proteína.

La proteína citocromo *c,* que consiste en una sola cadena polipeptídica de unos 104 residuos, es un ejemplo excelente de evolución a nivel molecular. El citocromo *c* se encuentra en todos los organismos aerobios y las secuencias de proteína en especies con relación lejana como mamíferos y bacterias se parecen lo bastante para llegar a la conclusión, con bastante seguridad, de que las proteínas son **homólogas**. (Se definen como homólogas a diferentes proteínas y genes si han descendido de un ancestro común. La prueba de homología se basa en la semejanza de la secuencia).

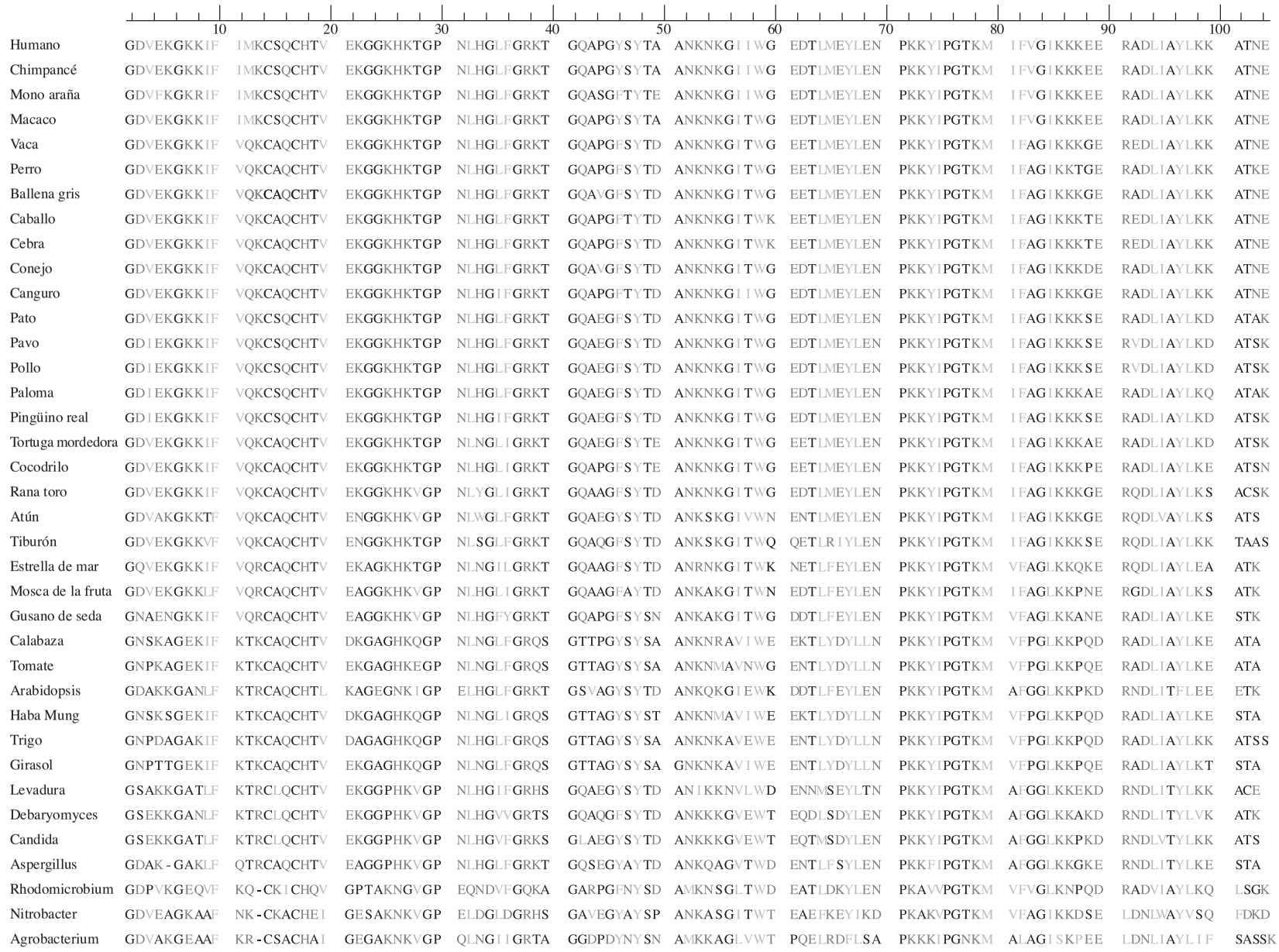
El primer paso para revelar las relaciones evolutivas es alinear las secuencias de aminoácidos en proteínas procedentes de varias especies. En la figura 3.23 se muestra un ejemplo de alineamiento para el citocromo *c*. El alineamiento revela una notable conservación de residuos en ciertas posiciones. Por ejemplo, todas las secuencias contienen una prolina en la posición 30 y una metionina en la posición 80. En general, los residuos conservados contribuyen a la estabilidad estructural de la proteína, o bien son esenciales para su función.

Hay selección contra toda sustitución de aminoácido en esas posiciones invariables. En otros sitios se observa una cantidad limitada de sustituciones. En la mayor parte de los casos, las sustituciones permitidas son residuos de aminoácido con propiedades parecidas. Por ejemplo, la leucina, isoleucina o valina pueden ocupar la posición 98; todas ellas son residuos hidrofóbicos. De manera similar, varios residuos polares diferentes pueden ocupar muchos sitios. Algunas posiciones son muy variables; los residuos en dichos sitios contribuyen poco a la estructura y función de la proteína, y la fijación de sustituciones en esas posiciones durante la evolución se debe a desplazamientos genéticos aleatorios.

Las secuencias de citocromo *c* de humanos y chimpancés son idénticas. Es un reflejo de su estrecha relación evolutiva. Las secuencias del mono y del macaco se parecen mucho a las de los humanos y los chimpancés, como era de esperar, ya que las cuatro especies son primates. De igual modo, las secuencias de las moléculas de citocromo *c* vegetal se parecen mucho entre sí, mucho más que lo que se parecen a cualquier otra secuencia.

La figura 3.24 en la página 80 ilustra las semejanzas entre las secuencias de citocromo en distintas especies representándolas como un árbol cuyas ramas tienen longitud proporcional a la cantidad de diferencias en las secuencias de aminoácido

Figura 3.23▶
Secuencias de citocromo *c*. Las secuencias de las proteínas citocromo *c* de varias especies se alinearon para mostrar sus semejanzas. En algunos casos se introdujeron huecos (llenos con guiones) para mejorar el alineamiento. Los huecos representan omisiones e inserciones en los genes que codifican esas proteínas. Para algunas especies, se omitieron residuos adicionales en los extremos de la secuencia. Los residuos hidrofóbicos están en azul y los residuos polares están en rojo. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).



(*Véase esta figura a todo color al final del libro*).

de la proteína. Las especies con relación cercana se agrupan en las mismas ramas del árbol porque sus proteínas son muy parecidas. A grandes distancias evolutivas la cantidad de diferencias puede ser muy grande. Por ejemplo, las secuencias bacterianas difieren en forma apreciable de las secuencias eucarióticas y reflejan la divergencia a partir de un ancestro común que vivió hace varios miles de millones de años. El árbol indica con claridad los tres reinos principales de los eucariotas: hongos, animales y plantas. (Las secuencias de protistas no se incluyen en este árbol para no complicarlo mucho).

Los árboles filogenéticos derivados de datos de secuencia suelen tener bastante coincidencia con aquellos construidos por biólogos evolutivos que usan datos morfológicos y el registro de fósiles. Los datos evolutivos moleculares a partir de comparaciones de secuencias proporcionan evidencia independiente de descendencia común.

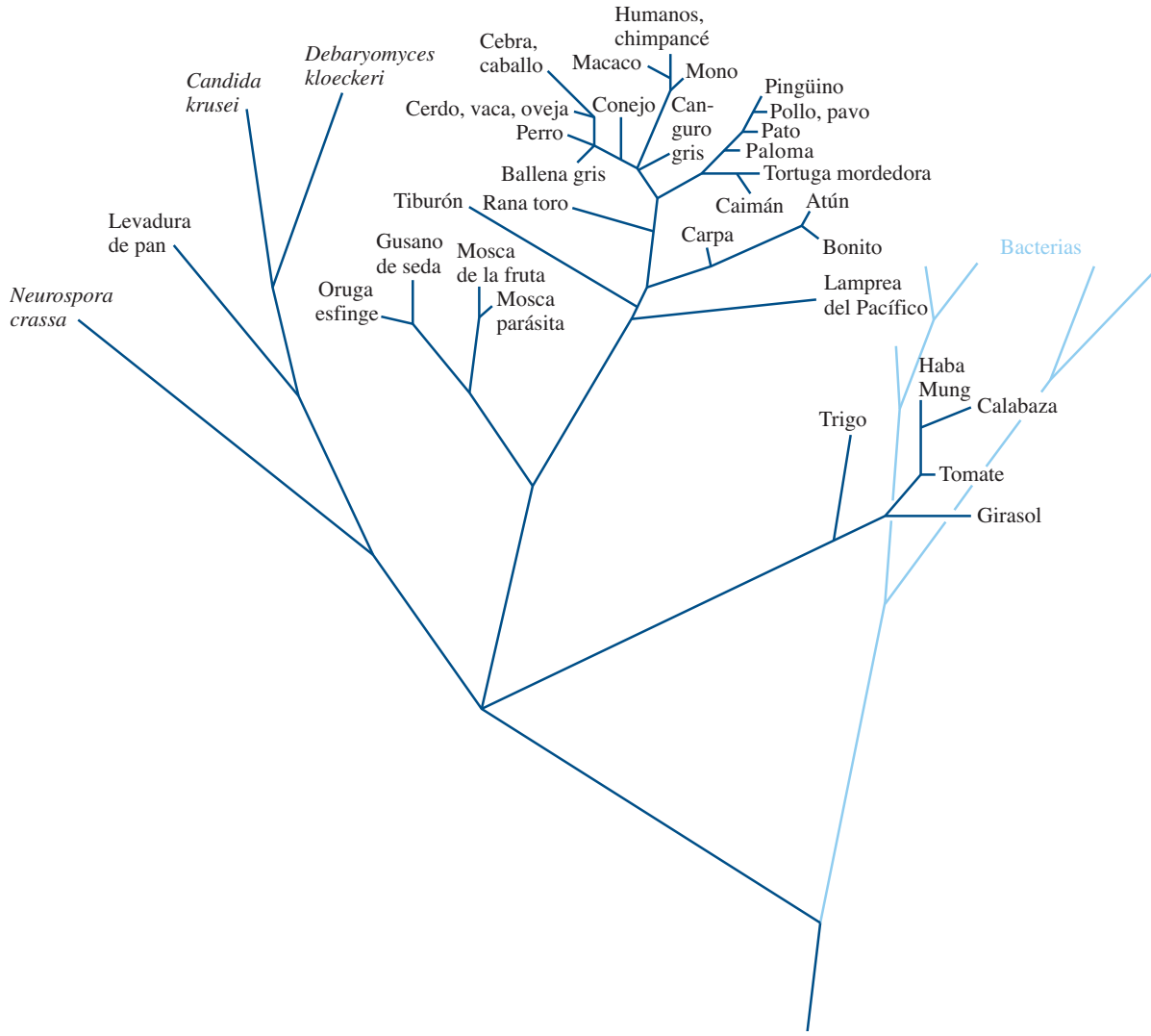


Figura 3.24 ▲
Árbol filogenético del citocromo *c*. La longitud de las ramas indica la cantidad de diferencias entre las secuencias de muchas proteínas de citocromo *c*. [Adaptado de Schwartz, R.M., y Dayhoff, M. O. (1978). Origins of prokaryotes, eucaryotes, mitochondria, and chloroplasts. *Science* 199:395-403].

Resumen

1. Las proteínas están formadas por 20 aminoácidos estándar y cada uno de ellos contiene un grupo amino, un grupo carboxilo y una cadena lateral, o grupo R. A excepción de la glicina, que no tiene carbono quiral, todos los aminoácidos en las proteínas tienen la configuración L.
2. Las cadenas laterales de los aminoácidos se pueden clasificar de acuerdo con sus estructuras químicas en: alifáticas, aromáticas, sulfuradas, alcoholes, bases, ácidos y amidas. Algunos de los aminoácidos se clasifican también como con cadenas laterales muy hidrofóbicas o muy hidrofílicas. Las propiedades de las cadenas laterales de los aminoácidos son determinantes en la estructura y las funciones de la proteína.
3. Las células contienen otros aminoácidos que no se usan en síntesis de proteínas. Algunos aminoácidos se pueden modificar químicamente para obtener compuestos que funcionen como hormonas o como neurotransmisores. Algunos aminoácidos se modifican después de incorporarlos en los polipéptidos.
4. A pH 7, el grupo α-carboxilo de un aminoácido tiene carga negativa (—$COO^{\ominus}$) y el grupo α-amino tiene carga positiva (—$NH_3^{\oplus}$). Las cargas de las cadenas laterales ionizables dependen del pH y también de sus valores de pK_a.
5. Los residuos de aminoácidos en las proteínas están unidos por enlaces peptídicos. La secuencia de residuos se llama estructura primaria de la proteína.
6. Las proteínas se purifican con métodos que aprovechan las diferencias de solubilidad, carga neta, tamaño y propiedades de unión de cada proteína individual.
7. Las técnicas analíticas, como SDS-PAGE y la espectrometría de masas, revelan las propiedades de las proteínas, como el peso molecular.
8. Se puede determinar la composición de aminoácidos de una proteína en forma cuantitativa hidrolizando los enlaces peptídicos y analizando el hidrolizado mediante cromatografía.
9. La secuencia de una cadena polipeptídica se determina con el procedimiento de degradación de Edman, en el que se separan e identifican sucesivamente los residuos N-terminales.
10. Las secuencias de polipéptidos grandes se pueden determinar por rompimiento selectivo de enlaces peptídicos usando proteasas o reactivos químicos, y después la degradación de Edman de los fragmentos que resulten.
11. Una comparación de secuencias procedentes de distintas especies revela relaciones evolutivas.

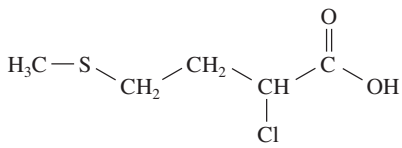
Problemas

1. Trace e identifique la estructura estereoquímica de la L-fenilalanina. Indique si es *R* o *S*, de acuerdo con el inserto 3.1 de la página 56.

2. Demuestre que la proyección de Fischer de la forma común de la treonina (página 59) corresponde a la (2*S*,3*R*)-treonina.

3. El diclorhidrato de histamina se administra a pacientes de melanoma (cáncer de la piel) en combinación con medicamentos anticancerosos porque hace que las células cancerosas sean más receptivas a los medicamentos. Dibuje la estructura química del diclorhidrato de histamina.

4. Se ha encontrado que el pescado seco y tratado con sal y nitratos contiene el mutágeno ácido 2-cloro-4-metiltiobutanoico (CMBA, de *chloro methylthiobutanoic acid*). ¿De cuál aminoácido se deriva el CMBA?



5. Para cada una de las siguientes cadenas laterales de aminoácido modificado, identifique al aminoácido a partir del cual se derivó y la clase de modificación química que ha habido.

   a) —$CH_2OPO_3^{2\ominus}$
   b) —$CH_2CH(COO^{\ominus})_2$
   c) —$(CH_2)_4$—NH—C(O)CH_3

6. El glutatión (GSH) (γ-Glu-Cys-Gly), un tripéptido, tiene una función protectora en los animales porque destruye los peróxidos tóxicos que se generan durante los procesos metabólicos aerobios. Dibuje la estructura química del glutatión. Nota: el símbolo γ indica que el enlace peptídico entre Glu y Cys se forma entre el carboxilo γ del Glu y el grupo amino de la Cys.

7. La melitina es un polipéptido de 26 residuos que se encuentra en el veneno de las abejas. En su forma monómera, se cree que la melitina se inserta en estructuras de membrana ricas en lípidos. Explique de qué forma la secuencia de aminoácidos en la melitina encierra esta propiedad.

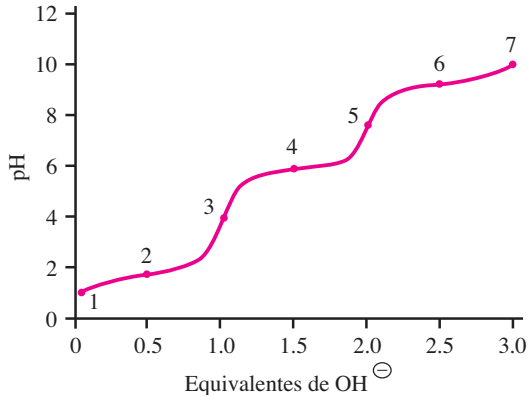
$H_3\overset{\oplus}{N}$-Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Gly-Leu
Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-NH_2
(1 … 26)

8. Calcule los puntos isoeléctricos de a) arginina y b) glutamato.

9. La oxitocina es un nonapéptido (péptido con nueve residuos) hormonal que interviene en la respuesta productora de leche en los mamíferos lactantes. Abajo se muestra la secuencia de una versión sintética de la oxitocina. ¿Cuál es la carga neta de este péptido a a) pH 2.0, b) pH 8.5 y c) pH 10.7? Suponga que los grupos ionizables tienen los valores de pK_a mencionados en la tabla 3.2. El enlace disulfuro es estable a pH 2.0, pH 8.5 y pH 10.7. Observe que el C-terminal está amidado.

$$\overset{1}{\text{Cys}}\text{—Phe—Ile—Glu—Asn—Cys—Pro—His—Gly—}NH_2$$
$$\text{S—S}$$

10. Abajo se ve la curva de titulación para la histidina. Los valores de pK_a son 1.8 (—COOH), 6.0 (cadena lateral) y 9.3 ($—NH_3^{\oplus}$).



a) Trace la estructura de la histidina en cada paso de ionización.

b) En la curva de titulación, identifique los puntos que correspondan a las cuatro especies iónicas.

c) Identifique los puntos en los que la carga neta promedio es +2, +0.5, 0 y −1.

d) Identifique el punto en el que el pH es igual al pK_a de la cadena lateral.

e) Identifique el punto que indique la titulación completa de la cadena lateral.

f) ¿Entre qué límites de pH sería la histidina un buen amortiguador?

11. Trace las siguientes estructuras de compuestos que habría durante el procedimiento de degradación de Edman: a) PTC-Leu-Ala, b) PTH-Ser, c) PTH-Pro.

12. Indique qué fragmentos se generarán con el tratamiento del siguiente péptido con: a) tripsina, b) quimotripsina y c) proteasa V8 de *S. aureus*.

Gly-Ala-Trp-Arg-Asp-Ala-Lys-Glu-Phe-Gly-Gln

13. Imagine que usted aisló un decapéptido (péptido con 10 residuos) llamado FP que tiene actividad anticancerígena. Determine la secuencia del péptido a partir de la información siguiente. (Observe que los aminoácidos se separan con comas, cuando no se conoce su secuencia).

a) Un ciclo de degradación de Edman del FP produce 2 moles de PTH-aspartato por mol de FP.

b) El tratamiento de una solución de FP con 2-mercaptoetanol, seguido por adición de tripsina, produce tres péptidos cuya composición es (Ala, Cys, Phe), (Arg, Asp) y (Asp, Cys, Gly, Met, Phe). El péptido (Ala, Cys, Phe) intacto produce PTH-cisteína en el primer ciclo de degradación de Edman.

c) El tratamiento de 1 mol de FP con carboxipeptidasa (que separa el residuo C-terminal de los péptidos) produce 2 moles de fenilalanina.

d) El tratamiento del pentapéptido intacto (Asp, Cys, Gly, Met, Phe) con BrCN produce dos péptidos cuya composición es (homoserina lactona, Asp) y (Cys, Gly, Phe). El péptido (Cys, Gly, Phe) produce PTH-glicina en el primer ciclo de degradación de Edman.

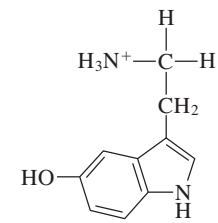
14. Una parte de las secuencias de aminoácidos en el citocromo *c* del caimán y de la rana toro se ven abajo (tomadas de la figura 3.23).

	Aminoácidos 31-50	
COCODRILO	NLHGLIGRKT	GQAPGFSYTE
RANA TORO	NLYGLIGRKT	GQAAGFSYTD

a) Indique un ejemplo de una sustitución que implique aminoácidos similares.

b) Describa un ejemplo de una sustitución más radical.

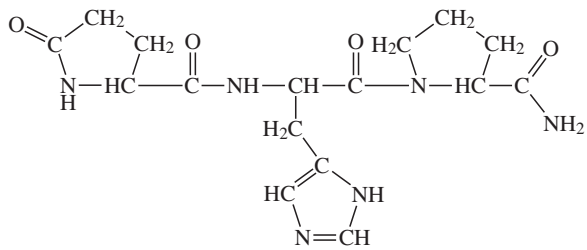
15. Varios aminoácidos comunes se modifican para producir aminas con importancia biológica. La serotonina es un neurotransmisor con importancia biológica que se sintetiza en el cerebro. Se han relacionado las bajas concentraciones de serotonina en el cerebro con estados como la depresión, agresión e hiperactividad. ¿De qué aminoácido se deriva la serotonina? Identifique las diferencias de estructura entre el aminoácido y la serotonina.



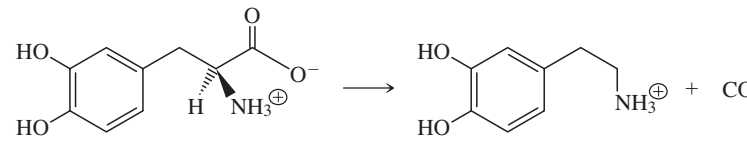
Serotonina

16. En la página siguiente se ve la estructura de la hormona liberadora de tirotropina (TRH, de *thyrotropin-releasing hormone*). La TRH es una hormona peptídica que en forma original se aisló de extractos de hipotálamo.

a) ¿Cuántos enlaces peptídicos hay en la TRH?
b) ¿De qué tripéptido se deriva la TRH?
c) ¿Qué resultado producen las modificaciones en las cargas de los grupos terminales amino y carboxilo?



17. La quiralidad juega un papel principal en el desarrollo de medicamentos nuevos. Las personas con mal de Parkinson tienen poca dopamina en su cerebro. Para tratar de aumentar la cantidad de dopamina en los pacientes, se les administra el medicamento L-dopa, que en el cerebro se convierte en dopamina. La L-dopa se vende en forma enantioméricamente pura. a) Indique la designación *RS* de L-dopa. b) ¿De qué aminoácido derivan la L-dopa y la dopamina?



L-Dopa Dopamina

Lecturas seleccionadas

Generalidades

Creighton, T. E. (1993). *Proteins: Structures and Molecular Principles*, 2nd Ed. (Nueva York, W. H. Freeman), Págs. 1-48. Esta sección de la monografía de Creighton presenta una excelente descripción de la química de los polipéptidos.

Greenstein, J. P., y Winitz, M. (1961). *Chemistry of the Amino Acids* (Nueva York: John Wiley & Sons).

Kreil, G. (1997). D-Amino Acids in Animal Peptides. *Annu. Rev. Biochem.* 66:337-345.

Meister, A. (1965). *Biochemistry of the Amino Acids*. 2nd Ed. (Nueva York: Academic Press). El volumen 1 de esta obra en 2 volúmenes es la referencia estándar para las propiedades de los aminoácidos.

Purificación y análisis de proteínas

Hearn, M. T. W. (1987). General strategies in the separation of proteins by high-performance liquid chromatographic methods. *J. Chromatog.* 418:3-26. Describe los parámetros generales de purificación de proteínas y también el uso de HPLC.

Mann, M., Hendrickson, R. C. y Pandry, A. (2001) Analysis of Proteins and Proteomes by Mass Spectrometry. *Annu. Rev. Biochem.* 70:437-473. Este repaso se enfoca hacia las técnicas modernas y el uso de la espectrometría de masas para identificar proteínas específicas a partir de información en bases de datos de proteínas.

Sherman, L. S., y Goodrich, J. A. (1985). The historical development of sodium docecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Chem. Soc. Rev.* 14:225-236.

Stellwagen, E. (1990). Gel filtration. *Methods Enzymol.* 182:317-328.

Análisis de aminoácidos

Ozols, J. (1990) Amino acid analysis. *Methods Enzymol.* 182:587-601.

Secuenciación de aminoácidos

Doolittle, R. F. (1989). Similar amino acid sequences revisited. *Trends Biochem. Sci.* 14:244-245. Descripción de la noción darwiniana de "descendencia con modificación" en términos de similitudes en las secuencias de aminoácidos.

Han, K.-K., Belaiche, D., Moreau, O., y Briand, G. (1985). Current developments in stepwise Edman degradation of peptides and proteins. *Int. J. Biochem.* 17:429-445.

Hunkapiller, M. W., Strickler, J. E., y Wilson, K. J. (1984). Contemporary methodology for protein structure determination. *Science* 226:304-311.

Sanger, F. (1988). Sequences, sequences, and sequences. *Annu. Rev. Biochem.* 57:1-28. La teoría de la secuenciación de proteínas, ARN y ADN.

4

capítulo cuatro

Proteínas: Estructura tridimensional y función

En el capítulo anterior se planteó que es posible describir a una proteína como una cadena de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos en una secuencia específica. Sin embargo, las cadenas polipeptídicas no sólo son lineales sino que también están dobladas en formas compactas que contienen espirales, regiones en zigzag, giros y asas. Durante los últimos 50 años se han determinado las formas tridimensionales o conformaciones de más de mil proteínas. Una **conformación** es un ordenamiento espacial de átomos que depende de la rotación de uno o varios enlaces. La *conformación* de una molécula, como la de una proteína, puede cambiar sin que los enlaces covalentes se rompan, mientras que las diversas *configuraciones* de una molécula sólo se pueden cambiar si se rompen y vuelven a unir enlaces covalentes. (Recuérdese que las formas L y D de los aminoácidos representan configuraciones diferentes). Ya que cada residuo de aminoácido tiene varias conformaciones posibles y dado que hay numerosos residuos en una proteína, cada proteína ofrece una cantidad astronómica de configuraciones potenciales. No obstante, bajo condiciones fisiológicas, cada proteína se dobla en una sola forma estable, que se llama su conformación nativa. Hay varios factores que restringen la rotación respecto a los enlaces covalentes en una cadena polipeptídica, en su conformación nativa. Incluyen la presencia de puentes de hidrógeno y otras interacciones libres entre residuos de aminoácidos. La función biológica de una proteína depende por completo de su conformación nativa.

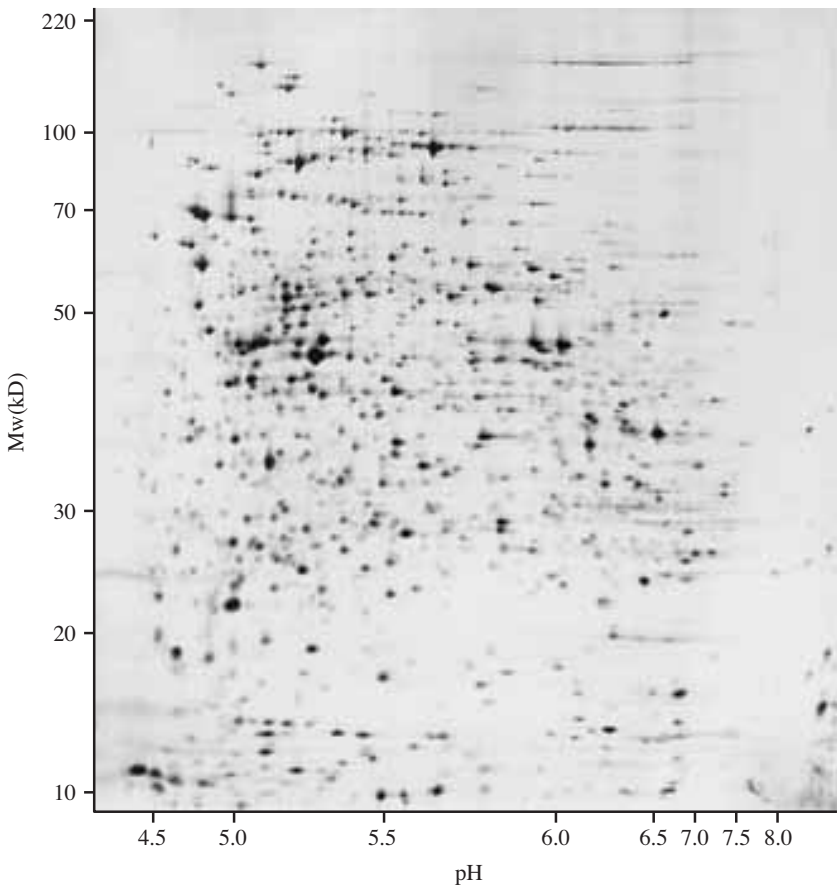
Una proteína puede ser una sola cadena polipeptídica o puede estar formada por varias de esas cadenas unidas entre sí por interacciones débiles. Como regla general, cada cadena polipeptídica es codificada por un solo gen, aunque hay algunas excepciones interesantes a esta regla. El tamaño de los genes y los polipéptidos que codifican puede variar en más de un orden de magnitud. Algunos polipéptidos sólo contienen 100 residuos de aminoácido, con una masa molecular relativa aproximada de 11 000 (M_r = 11 000). (La masa molecular relativa de un residuo de aminoácido en una proteína es 110). Por otra parte, algunas cadenas muy grandes de polipéptido contienen más de 2000 residuos de aminoácido (M_r = 220 000).

Arriba: Borrego cimarrón. Su piel, lana y cuernos están formados principalmente por proteínas fibrosas.

En algunas especies se pueden determinar el tamaño y la secuencia de cada polipéptido a partir de la secuencia del genoma. Puede haber unos 4000 polipéptidos distintos en la bacteria *Escherichia coli* con un tamaño promedio de unos 300 residuos de aminoácidos (Mr = 33 000). La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* contiene unos 14 000 polipéptidos diferentes con un tamaño promedio más o menos igual que en la bacteria. Los humanos y otros mamíferos tienen unos 30 000 polipéptidos distintos. El estudio de grandes conjuntos de proteínas, como el de todo el complemento de proteínas producidas por una célula, es parte de un campo emergente llamado **proteómica**.

Las proteínas tienen diversas formas. Muchas son macromoléculas aproximadamente esféricas, hidrosolubles y compactas cuyas cadenas polipeptídicas están dobladas de manera apretada. Esas **proteínas globulares** tienen un interior hidrofóbico y una superficie hidrofílica, en forma característica. Poseen penetraciones o fisuras que reconocen en forma específica a otros compuestos y se unen a ellos en forma transitoria. Al enlazarse selectivamente con otras moléculas, dichas proteínas sirven como agentes dinámicos de la acción biológica. Varias proteínas globulares son enzimas, los catalizadores bioquímicos de las células. Más o menos 31% de los polipéptidos en la *E. coli* se consideran enzimas metabólicas, como las que se describirán en los siguientes capítulos. Hay otros tipos de proteínas globulares que incluyen diversos factores, proteínas portadoras y proteínas reguladoras; el 12% de las proteínas conocidas en la *E. coli* caen en estas categorías.

También los polipéptidos pueden ser partes de grandes estructuras subcelulares o extracelulares, como ribosomas, flagelos y cilios, músculos y cromatina. Las **proteínas fibrosas** son una clase particular de proteínas estructurales que proporcionan soporte mecánico a las células u organismos. En el caso típico, las proteínas fibrosas se ensamblan en grandes cables o hebras. Como ejemplos de proteínas fibrosas están la α-queratina, el componente principal de cabello y uñas, y la colágena, el componente proteínico



◀ Proteínas de la *Escherichia coli*. Las proteínas celulares de la *E. coli* se han separado por electroforesis bidimensional en gel. En la primera dimensión, las proteínas se separan por un gradiente de pH y cada proteína migra hasta su punto isoeléctrico. La segunda dimensión separa a las proteínas por su tamaño en un gel de SDS-poliacrilamida. Cada mancha corresponde a un solo polipéptido. Hay unas 4000 proteínas diferentes en la *E. coli*, pero algunas sólo están presentes en cantidades muy pequeñas y no se pueden apreciar en este gel de 2-D. Esta figura se tomó de la base de datos Swiss-2D PAGE. Puede usted visitar este sitio y hacer clic en cualquiera de las manchas para conocer más acerca de determinada proteína.

principal de tendones, piel, huesos y dientes. Entre otros ejemplos de proteínas estructurales están los componentes proteínicos de virus, bacteriófagos, esporas y polen.

Muchas proteínas son componentes integrales de membranas o proteínas asociadas a membranas. Esta categoría contiene al menos 16% de los polipéptidos conocidos en la *E. coli* y un porcentaje mucho mayor en las células eucarióticas.

En este capítulo se describe la arquitectura molecular de las proteínas. Se explora la conformación del enlace peptídico y se estudia que hay dos formas simples, la hélice α y la lámina β, que son elementos estructurales comunes en todas las clases de proteínas. Se describen niveles mayores en la estructura de las proteínas y también el plegado y la estabilización de las proteínas. Por último, se examina la forma en que la estructura de la proteína se relaciona con su función, y como ejemplo se presenta la colágena, hemoglobina y los anticuerpos. Ante todo se habrá de aprender que las proteínas encierran propiedades que trascienden a las de los aminoácidos libres. Los capítulos 5 y 6 describen el papel de las proteínas como enzimas. En el capítulo 9 se describen con más detalle las estructuras de las proteínas de membrana, y en los capítulos 20 a 23 las proteínas que se unen a ácidos nucleicos.

4.1 Hay cuatro niveles de estructura de las proteínas

Las moléculas individuales de proteína se pueden describir mediante hasta cuatro niveles de estructura (figura 4.1). Como se hizo notar en el capítulo 3, la estructura primaria describe la secuencia lineal de residuos de aminoácidos en una proteína. Recuérdese que las secuencias de aminoácidos siempre se escriben desde el amino terminal (N-terminal) hasta el carboxilo terminal C- (C-terminal). La estructura tridimensional de una proteína se describe con tres niveles adicionales: estructura secundaria, estructura terciaria y estructura cuaternaria. Las fuerzas que mantienen, o estabilizan, estos tres niveles son no covalentes, de manera primordial. La **estructura secundaria** se refiere a las regularidades en las conformaciones locales mantenidas por puentes de hidrógeno entre los hidrógenos de amida y los oxígenos de carbonilo en la columna vertebral del péptido. Las estructuras secundarias principales son las hélices α y las hebras β (incluyendo las lámi-

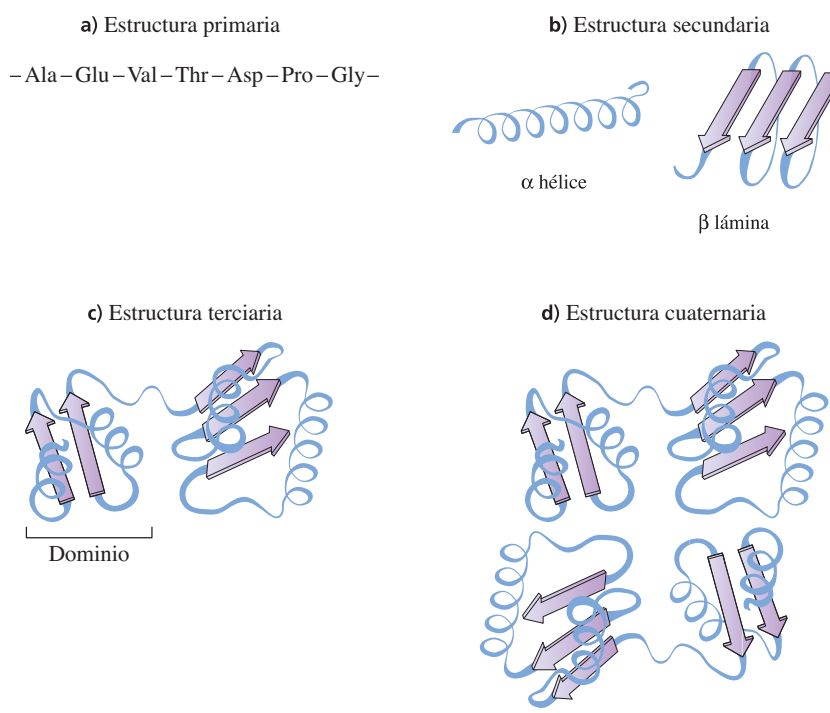


Figura 4.1▶
Niveles estructurales de proteínas. **a)** La secuencia lineal de aminoácidos define la estructura primaria. **b)** La estructura secundaria consiste en regiones de conformaciones repetitivas periódicas de la cadena de péptidos, como hélices α y láminas β. **c)** La estructura terciaria describe la forma de la cadena de polipéptidos totalmente plegada. El ejemplo que se muestra tiene dos dominios. **d)** La estructura cuaternaria se refiere al ordenamiento de dos o más cadenas de polipéptido en una molécula de subunidades múltiples.

nas α). Se acostumbra representar las regiones helicoidales α con dibujos que muestran las estructuras de proteínas plegadas; las hebras β se representan con flechas anchas que apuntan desde la dirección N-terminal hacia la C-terminal. La **estructura terciaria** describe la cadena polipeptídica totalmente plegada y compactada. Muchos polipéptidos plegados consisten en varias unidades distintas unidas por un tramo corto de residuos de aminoácidos, como se ve en la figura 4.1c; a dichas unidades se les conoce como **dominios.** Las estructuras terciarias se estabilizan por las interacciones de cadenas laterales de aminoácidos en regiones no vecinas de la cadena polipeptídica. La formación de la estructura terciaria acerca partes lejanas de las estructuras primaria y secundaria. Algunas proteínas poseen **estructura cuaternaria**, que implica la asociación de dos o más cadenas polipeptídica en una multisubunidad, o proteína oligomérica u oligómera. Las cadenas polipeptídicas de una proteína oligómera pueden ser idénticas o distintas.

4.2 Métodos para determinar la estructura de las proteínas

Como se estudió en el capítulo 3, la secuencia de aminoácidos en los polipéptidos (es decir, la estructura primaria) se puede determinar por métodos químicos, como la degradación de Edman, o en forma indirecta, a partir de la secuencia del gen. La técnica acostumbrada para determinar la conformación tridimensional de una proteína es la cristalografía con rayos X. En esta técnica se apunta un haz de rayos X colimados, o paralelos, a un cristal de moléculas de proteína. Los electrones en el cristal difractan los rayos X, que se registran entonces en una película, o mediante un detector electrónico (figura 4.2). El análisis matemático de la figura de difracción produce una imagen de las nubes de electrones que rodean a los átomos en el cristal. Este mapa de densidad electrónica revela la forma general de la molécula y las posiciones de cada uno de los átomos en el espacio tridimensional. Al combinar esos datos con los principios del enlazamiento químico es posible deducir el lugar de todos los enlaces en una molécula y en consecuencia su estructura general. La técnica de cristalografía con rayos X se ha desarrollado hasta el punto en que es posible determinar la estructura de una proteína sin tener un conocimiento preciso de la secuencia de aminoácidos. En la práctica ese conocimiento facilita mucho el ajuste del mapa de densidad electrónica en la etapa en la que se determinan los enlaces químicos entre los átomos.

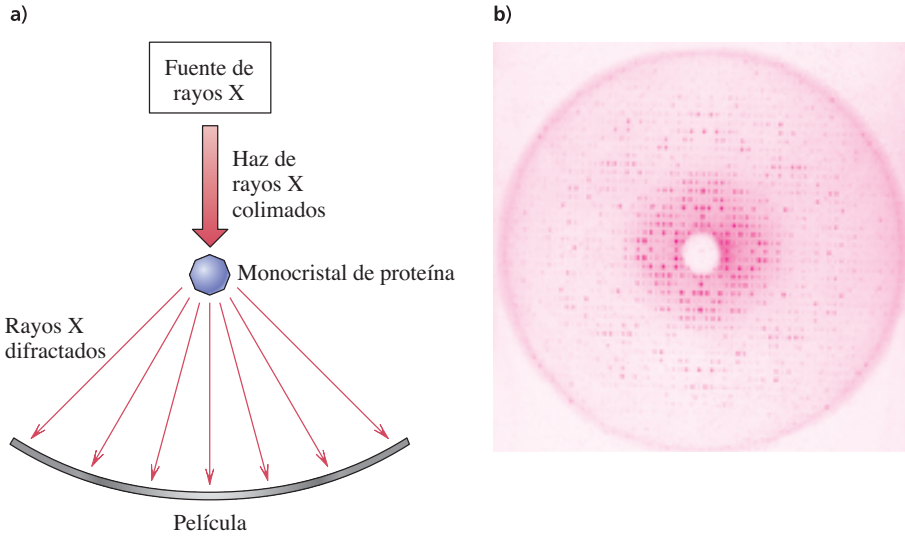


Figura 4.2 ▲
Cristalografía de rayos X. **a)** Diagrama de los rayos X difractados por un cristal de proteína. **b)** Figura de difracción de rayos X para un cristal de desoxihemoglobina de humano adulto. El lugar y la intensidad de las manchas determinan la estructura tridimensional de la proteína.

Al principio se usaba la cristalografía con rayos X para estudiar las unidades repetitivas simples de las proteínas fibrosas y las estructuras de pequeñas moléculas biológicas. Dorothy Crowfoot Hodgkin fue precursora en la aplicación de cristalografía de moléculas biológicas con rayos X. Resolvió la estructura de la penicilina en 1947 y desarrolló varias de las técnicas que se utilizan para estudiar las proteínas grandes. Hodgkin recibió el Premio Nobel en 1964 por determinar la estructura de la vitamina B_{12} y después publicó la estructura de la insulina.

El principal impedimento para determinar la estructura tridimensional de una proteína completa radicaba en la dificultad para calcular las posiciones atómicas a partir de las posiciones e intensidades de los haces difractados de rayos X. No es de sorprender que el desarrollo de la cristalografía de macromoléculas con rayos X siguió al desarrollo de las computadoras. Para 1962, John C. Kendrew y Max Perutz habían dilucidado las estructuras de las proteínas mioglobina y hemoglobina, respectivamente. Sus resultados proporcionaron los primeros conocimientos de la naturaleza de las estructuras terciarias de las proteínas y les valieron un Premio Nobel en 1962. En años recientes han habido avances importantes en la tecnología debido a la disponibilidad de computadoras de alta velocidad y por las mejoras en la producción de haces enfocados de rayos X. Hoy, la determinación de las estructuras de las proteínas se limita sobre todo por la dificultad en la preparación de cristales de una calidad adecuada para la difracción con rayos X.

Un cristal de proteína contiene una gran cantidad de moléculas de agua y con frecuencia es posible difundir pequeños ligandos, como moléculas de un sustrato o de inhibidor en el cristal. En muchos casos, las proteínas en el interior del cristal conservan su capacidad de unirse a esos ligandos y con frecuencia presentan actividad catalítica. La actividad catalítica de las enzimas en el estado cristalino demuestra que las proteínas cristalizan en sus conformaciones nativas *in vivo*. Así, las estructuras de proteínas que se resuelven por cristalografía con rayos X son representaciones reales de las estructuras que existen en el interior de las células.

Una vez determinadas las coordenadas tridimensionales de los átomos en una macromolécula, se depositan en un banco de datos, donde quedan a disposición de otros investigadores. Las primeras bases de datos de dominio público para estructuras y secuencias biomoleculares se establecieron a finales de la década de 1970. Muchas de las imágenes en este texto se crearon usando archivos de datos del banco Protein Data Bank (PDB). Primero se mencionará el nombre o número de entrada al PDB para cada estructura de proteína que aparezca en este texto con el propósito de que el lector pueda ver la estructura tridimensional en su propia computadora.

▲ Dorothy Crowfoot Hodgkin (1910-1994) recibió el Premio Nobel 1964 por determinar la estructura de la vitamina B_{12}. La estructura de la insulina fue publicada en 1969.

Visite el sitio Web para conocer información sobre la mejor manera de ver estructuras tridimensionales y obtener archivos de datos.

▶ Max Perutz (1914-2002) (izquierda) y John C. Kendrew (1917-1997) (derecha). Kendrew determinó la estructura de la mioglobina, por lo que recibió el Premio Nobel en 1962. A Perutz se le otorgó también el Premio Nobel en 1962 por determinar la estructura de la hemoglobina.

Hay muchas maneras de exhibir la estructura tridimensional de las proteínas. Los modelos volumétricos (figura 4.3a) muestran a cada átomo como una esfera maciza. Tales imágenes muestran la naturaleza densa y muy empacada de las cadenas polipeptídicas plegadas. Estos modelos de estructuras se usan para ilustrar la forma general de una proteína y la superficie expuesta a un solvente acuoso. Se puede apreciar con facilidad que el interior de las proteínas plegadas es casi impenetrable hasta para moléculas pequeñas como las del agua.

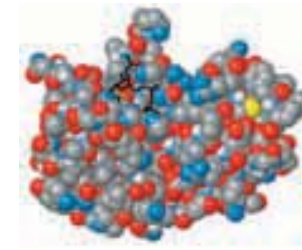
También se puede representar la estructura de una proteína en forma de un dibujo simplificado que exagera la columna vertebral de la cadena polipeptídica (figura 4.3b). En esos modelos se eliminan las cadenas laterales de aminoácidos para facilitar la apreciación de la forma en que el polipéptido se dobla y forma una estructura tridimensional. Esos modelos tienen la ventaja de permitir ver al interior de la proteína y también revelan elementos de la estructura secundaria, como hélices α y hebras β. Al comparar las estructuras de proteínas diferentes es posible reconocer los pliegues y patrones comunes que no es posible ver en los modelos volumétricos.

Los modelos más detallados son los que destacan las estructuras de las cadenas laterales de aminoácidos y los diversos enlaces covalentes e interacciones débiles entre los átomos (figura 4.3c). Esos modelos detallados tienen importancia especial para comprender la forma en que se une un sustrato en el sitio activo de una enzima. En la figura 4.3c se muestra la columna vertebral con la misma orientación que en la figura 4.3b.

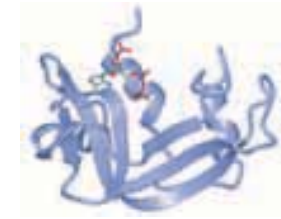
Otra técnica para analizar la estructura macromolecular de las proteínas es la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) (o NMR, de *nuclear magnetic resonance*). Este método permite estudiar las proteínas en solución, por lo que no requiere la tediosa preparación de cristales. En la espectroscopia de RMN se coloca una muestra de la proteína en un campo magnético. Ciertos núcleos atómicos absorben radiación electromagnética cuando el campo magnético aplicado se varía. Ya que los átomos vecinos influyen en la absorbancia, se pueden registrar interacciones entre átomos cercanos entre sí. Al combinar estos resultados con la secuencia de aminoácidos y con restricciones estructurales conocidas es posible calcular una cantidad de estructuras que satisfagan las interacciones observadas.

La figura 4.4 muestra el conjunto completo de estructuras de la ribonucleasa A bovina, la misma proteína cuya estructura cristalina determinada con rayos X se muestra en la figura 4.3. Nótese que las estructuras posibles son muy parecidas y que la forma general de la molécula se aprecia con facilidad. En algunos casos el conjunto de estructuras de RMN puede tener fluctuaciones o "respiraciones" de la proteína en solución. La semejanza de las estructuras de RMN y las cristalinas con rayos X indica que las estructuras de proteína encontradas en los cristales representan fielmente la estructura de la proteína en solución. En general, los espectros de RMN de pequeñas proteínas, como la ribonucleasa A, se pueden deducir con facilidad, pero el espectro de una molécula grande puede ser en extremo complicado. Por esta razón es muy difícil determinar la estructura de las proteínas mayores, pero la técnica es muy poderosa para las proteínas más pequeñas.

a)



b)



c)

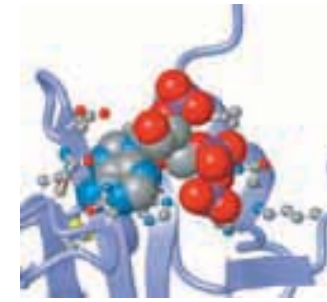


Figura 4.3 ▲
Ribonucleasa A bovina (*Bos taurus*). La ribonucleasa A es una enzima secretada que hidroliza al ARN durante la digestión. **a)** Modelo tridimensional mostrando un sustrato análogo enlazado en negro. **b)** Modelo de listón de la cadena de polipéptido mostrando la estructura secundaria. **c)** Vista del sitio de enlace con el sustrato. El análogo de sustrato (3-fosfato de 5′-difosfoadenosina) se representa como modelo tridimensional y las cadenas laterales de aminoácidos se muestran como modelos de bolas y palillos. [PDB 1 AFK]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

◀ Figura 4.4
Estructura de la ribonucleasa bovina A por RMN. En la figura se combina un conjunto de estructuras muy parecidas que satisfacen los datos de interacciones atómicas. Sólo se muestra la espina dorsal de la cadena de polipéptido. Compárese esta estructura con la de la figura 4.3b y nótese la presencia de puentes de disulfuro (en amarillo), que no se muestran en las imágenes obtenidas por la estructura cristalina mediante rayos X. [PDB 2AAS]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

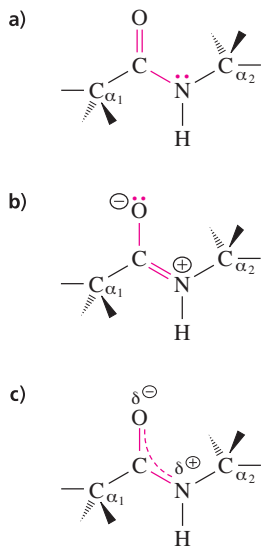


Figura 4.5 ▲
Estructura de resonancia del enlace peptídico. **a)** En esta forma de resonancia, el enlace peptídico se muestra como enlace sencillo C—N. **b)** En esta forma de resonancia, el enlace peptídico se muestra como un doble enlace. **c)** La estructura real se representa mejor como híbrido de una de las dos formas de resonancia en la que los electrones están deslocalizados sobre el oxígeno carbonílico, el carbono carbonílico y el nitrógeno amídico. La rotación en torno al enlace C—N se halla restringida debido a la naturaleza de enlace doble de la forma híbrida de resonancia.

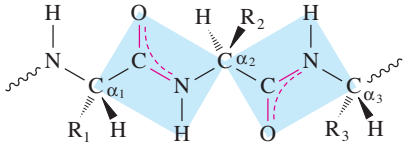


Figura 4.6 ▲
Grupos peptídicos planos en una cadena de polipéptido. Un grupo peptídico consiste en los grupos N—H y C═O que intervienen en su formación, al igual que los carbonos α a cada lado del enlace peptídico. Los dos grupos peptídicos están destacados en gris en este diagrama.

4.3 Conformación del grupo peptídico

Nuestro estudio detallado de la estructura de las proteínas comienza con la de los enlaces peptídicos, o enlaces de péptido, que unen a los aminoácidos en una cadena polipeptídica. Los dos átomos que intervienen en el enlace peptídico, junto con sus cuatro sustituyentes (el átomo de oxígeno carbonílico, el átomo de hidrógeno de amida y los dos átomos adyacentes de carbono α) constituyen el grupo peptídico. Los análisis cristalográficos de pequeños péptidos con rayos X revelan que el enlace entre el carbono carbonílico y el nitrógeno es más corto que un enlace sencillo típico C—N, pero más largo que los dobles enlaces C═N típicos. Además, el enlace entre el carbono carbonílico y el oxígeno es un poco mayor que el doble enlace típico C═O. Esas mediciones indican que los enlaces peptídicos tienen ciertas propiedades del enlace doble y se pueden representar mejor como un híbrido de resonancia (figura 4.5).

Nótese que el grupo peptídico es polar. El oxígeno carbonílico presenta una carga negativa parcial y puede servir como aceptador de hidrógeno en puentes de hidrógeno. El nitrógeno cuenta con una carga positiva parcial y el grupo —NH puede servir como donador de hidrógeno en puentes de hidrógeno. La deslocalización electrónica y el carácter parcial de enlace doble del enlace peptídico evitan que haya rotación libre en torno al enlace C—N. El resultado es que los átomos del grupo peptídico están en el mismo plano (figura 4.6). Todavía es posible la rotación respecto a cada enlace N—C_α y cada enlace C_α en la columna vertebral repetitiva de N—C_α—C en las proteínas. Como se verá, las restricciones a la rotación libre respecto a estos dos enlaces adicionales determinan en último término la conformación tridimensional de una proteína.

Debido a la naturaleza del doble enlace en el enlace peptídico, la conformación del grupo peptídico se restringe a una de dos conformaciones posibles, que puede ser *trans* o *cis* (figura 4.7). En la conformación *trans*, los dos carbonos α de residuos adyacentes de aminoácido están en lados opuestos del enlace peptídico y en las esquinas opuestas del rectángulo que forma el grupo peptídico plano. En la conformación *cis*, los dos carbonos α están en el mismo lado del enlace peptídico y están más cerca entre sí. Las conformaciones *cis* y *trans* se producen durante la síntesis de la proteína, cuando el enlace peptídico se forma uniendo dos aminoácidos a la cadena polipeptídica. Las dos conformaciones no se pueden interconvertir por giro respecto al enlace peptídico, una vez formado. La conformación *cis* es menos favorable que la conformación *trans*, que es extendida debido a impedimentos estéricos entre las cadenas laterales unidas a los dos átomos de carbono α. En consecuencia, casi todos los grupos peptídicos en las proteínas tienen la conformación *trans*. Hay raras excepciones, por lo general en los enlaces que tienen el nitrógeno de amida de la prolina, para el que la conformación *cis* sólo crea una interferencia estérica un poco mayor que la conformación *trans*.

Existen unas enzimas específicas, llamadas isomerasas de peptidilprolilo *cis/trans*, que pueden catalizar la interconversión de conformaciones *cis* y *trans* en residuos de prolina, con desestabilización momentánea de la estructura del híbrido de resonancia del enlace peptídico y permitiendo la rotación. La isomerasa de peptidilprolilo *cis/trans* es el blanco de la sustancia inmunosupresora ciclosporina A, empleada en los pacientes con trasplantes para evitar el rechazo del órgano donado. (Hoy se conoce que no hay

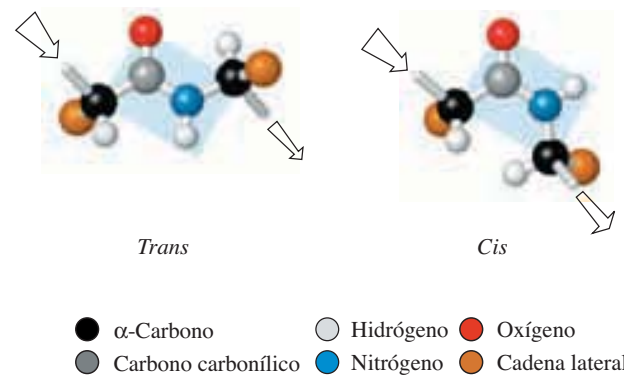
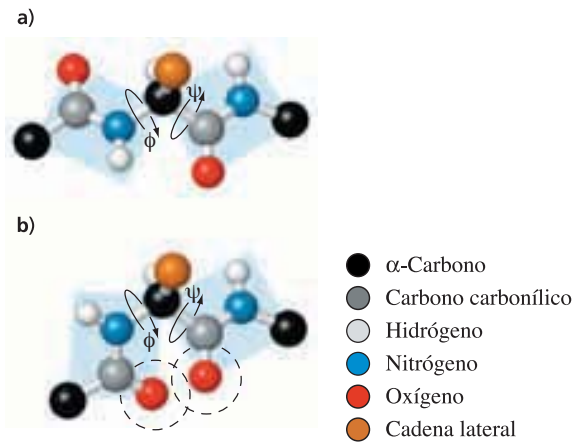


Figura 4.7 ▶
Conformaciones *trans y cis* de un grupo peptídico. Casi todos los grupos peptídicos en las proteínas tienen la conformación trans, lo que minimiza la interferencia estérica entre cadenas laterales adyacentes. Las flechas indican la dirección desde el N-terminal hasta el C. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).



◀ Figura 4.8
Rotación respecto a los enlaces N—C_α y C_α—C, que unen a los grupos peptídicos en una cadena de polipéptido. **a)** Grupos peptídicos en conformación extendida. **b)** Grupos peptídicos en conformación inestable debida a interferencia estérica entre oxígenos carbonílicos de residuos adyacentes. Los radios de van der Waals de los átomos de oxígeno carbonílico se indican con líneas entrecortadas. El ángulo de rotación en torno al enlace N—C_α se llama ϕ (fi) y el ángulo en torno al enlace C—C_α se llama ψ (psi). Los sustituyentes de los carbonos α externos se omitieron para mayor claridad. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

relación entre la actividad isomerasa *cis/trans* de la enzima y la inmunosupresión. En vez de ello, la enzima funciona como portadora de la ciclosporina A e interactúa con otras proteínas que son inhibidas por el medicamento). La estructura de la isomerasa humana de peptidilprolilo *cis/trans* se ve en la figura 4.23e.

Recuérdese que aun cuando los átomos del grupo peptídico están en un plano, es posible la rotación en torno a los enlaces N—C_α y C_α—C en la columna vertebral repetitiva de N—C_α—C. Esta rotación se halla restringida por interferencia estérica entre los átomos de la cadena principal y los de la cadena lateral de residuos adyacentes. Una de las restricciones más importantes para la rotación libre es la interferencia estérica entre los oxígenos carbonílicos en residuos adyacentes de aminoácido de la cadena de polipéptido (figura 4.8). La presencia de cadenas laterales voluminosas también restringe la rotación libre respecto a los enlaces N—C_α y C_α—C. La prolina es un caso especial: la rotación está restringida en torno al enlace N—C_α porque es parte de la estructura del anillo de pirrolidina en la prolina.

Al ángulo de rotación respecto al enlace N—C_α de un péptido se le representa por ϕ (fi), y al que hay respecto al enlace C_α—C se le designa ψ (psi). El ángulo del enlace peptídico es ω (omega). Debido a que la rotación en torno a los enlaces peptídicos se evita por su carácter de enlace doble, la mayor parte de la conformación de la columna vertebral de un polipéptido se puede describir mediante ϕ y ψ. Cada uno de estos ángulos se define por las posiciones relativas de cuatro átomos de la columna vertebral. Los ángulos en la dirección de las manecillas del reloj son positivos, y los contrarios a las manecillas del reloj son negativos, cada uno con un barrido de 180°. Así, cualquiera de los ángulos de rotación puede ir de –180° hasta +180°.

El biofísico G. N. Ramachandran y sus colegas elaboraron modelos tridimensionales de péptidos e hicieron cálculos para determinar cuáles valores de ϕ y de ψ están permitidos estéricamente en una cadena de polipéptido. Los ángulos permisibles se muestran como regiones sombreadas en diagramas de Ramachandran, de ϕ en función de ψ. La figura 4.9a en la página siguiente muestra los resultados de cálculos teóricos —las regiones sombreadas oscuras representan ángulos permisibles para la mayor parte de los residuos, y las áreas más claras abarcan los valores de ϕ y de ψ para residuos menores de aminoácido en que los grupos R no restringen la rotación. En un diagrama de Ramachandran las áreas blancas son áreas no permisibles sobre todo por impedimentos estéricos. Las concentraciones de varios tipos de estructura secundaria ideal caen entre las áreas sombreadas, como era de esperarse.

En la figura 4.9b se ve otra versión de un diagrama de Ramachandran. Esta gráfica se basa en los ángulos ϕ y ψ de cientos de proteínas cuyas estructuras se conocen. Las regiones internas encerradas representan ángulos que se ven con mucha frecuencia y las regiones cerradas externas representan ángulos menos frecuentes. Se grafican los ángulos observados típicos para hélices α, láminas β y otras estructuras de una proteína. La diferencia más importante entre los diagramas de Ramachandran teóricos y observados es la región en torno a 0° ψ, – 90° ϕ. Esta región no debería estar permitida, de acuerdo con los estudios de modelado, pero hay muchos ejemplos de residuos con dichos ángulos. Sucede que los choques estéricos se evitan en esas regiones al permitir

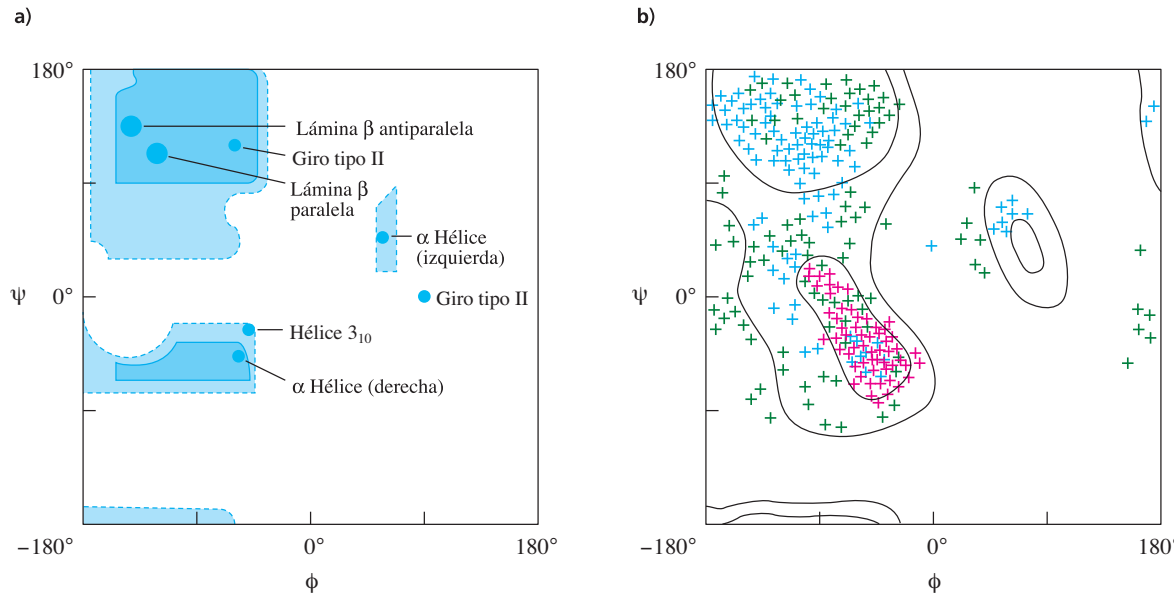
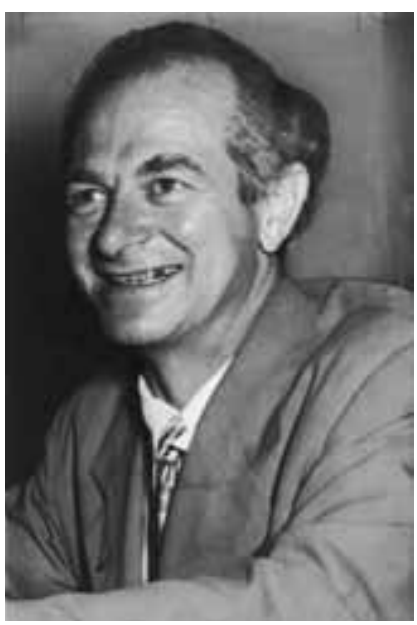


Figura 4.9 ▲
Diagrama de Ramachandran. **a)** Las líneas llenas indican los límites de valores permisibles de ϕ y ψ, de acuerdo con los modelos moleculares. Las líneas entrecortadas indican los límites externos de un residuo de alanina. Los puntos grandes corresponden a valores de ϕ y de ψ que producen conformaciones reconocibles, como la hélice α y las láminas β. Las posiciones que se indican para el giro tipo II son para el segundo y tercer residuos. Las partes blancas del diagrama corresponden a valores de ϕ y de ψ que se preveían presentarse rara vez. **b)** Valores observados de ϕ y de ψ en estructuras conocidas. Las cruces indican valores en residuos típicos en una sola proteína. Los residuos en una hélice α se muestran en rojo, y los residuos en las hebras β están en azul y otros más en verde. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

una pequeña cantidad de rotación respecto al enlace peptídico. El grupo peptídico no tiene por qué ser exactamente plano —¡se permite un poquito de culebreo!

Algunos residuos voluminosos de aminoácido tienen menores áreas permitidas. La prolina se restringe a valores de ϕ aproximados de –60° a –77°, porque el enlace N—C_α está restringido por inclusión en el anillo de pirrolidina de la cadena lateral. En contraste, la glicina está exenta de muchas restricciones estéricas porque carece de carbono β. Así, los residuos de glicina tienen mayor libertad de conformación que otros residuos y presentan valores de ϕ y de ψ que con frecuencia salen de las regiones sombreadas del diagrama de Ramachandran.



▲Linus Pauling (1901-1994), ganador del Premio Nobel de Química en 1954 y del Premio Nobel de la Paz en 1962.

4.4 La hélice α

La conformación helicoidal α fue propuesta por Linus Pauling y Robert Corey en 1950. Tuvieron en cuenta las dimensiones de los grupos peptídicos, las posibles restricciones estéricas y las oportunidades de estabilización por formación de puentes de hidrógeno. Su modelo explicó la principal repetición observada en la estructura de la ψ-queratina, una proteína fibrosa. Sucede que esta repetición de 0.50 a 0.55 nm es el paso (la distancia axial por cada vuelta) de la hélice α. Max Perutz agregó otros apoyos a la estructura al observar una unidad repetitiva secundaria de 0.15 nm en la figura de difracción de rayos X de la queratina α. Esta repetición de 0.15 nm corresponde a la elevación o subida de la hélice α (la distancia que cada residuo en la hélice avanza a lo largo de su eje). Perutz también demostró que la hélice α estaba presente en la hemoglobina y con ello confirmó que esta conformación existe en proteínas globulares más complejas.

En teoría, una hélice α puede ser una rosca izquierda o derecha. Las hélices α que se encuentran en las proteínas casi siempre son derechas, como se ve en la figura 4.10. En una hélice α ideal, el paso es de 0.54 nm, la elevación es de 0.15 nm y la cantidad de residuos de aminoácidos necesaria para una vuelta completa es de 3.6 (es decir, aproximada-

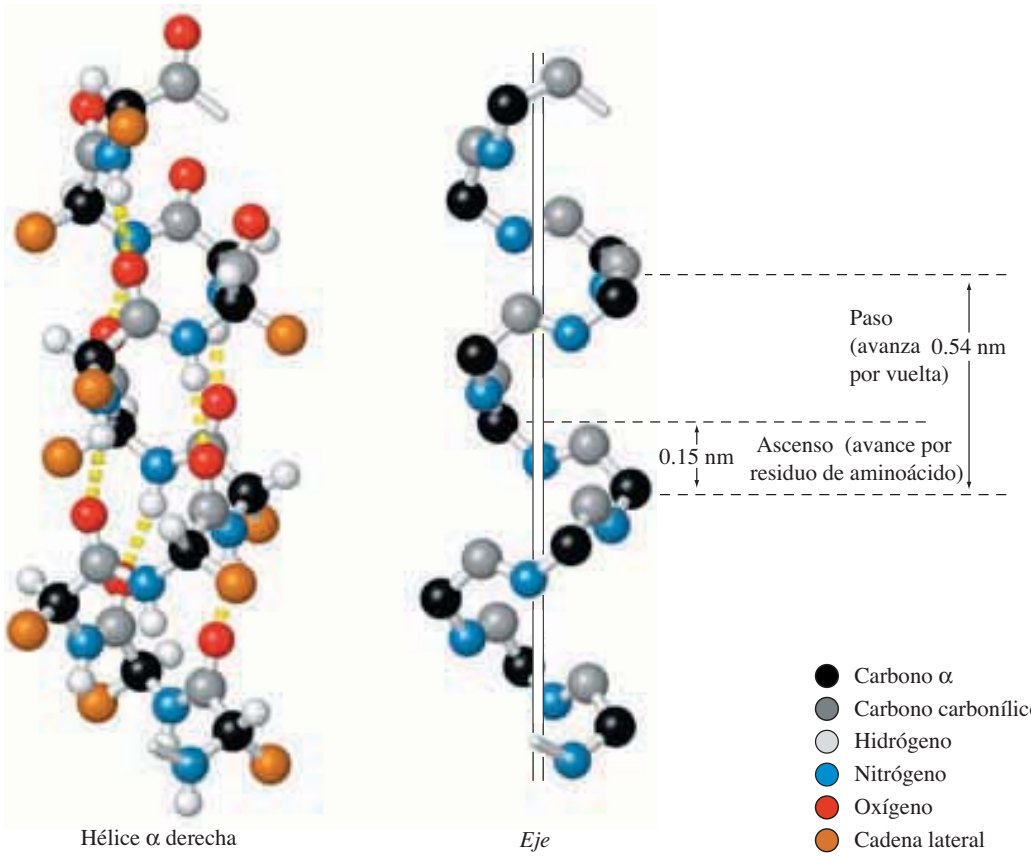


Figura 4.10 ▲
Hélice α. Se muestra una región de la estructura secundaria helicoidal α con el N-terminal en la parte inferior y el C-terminal en la parte superior de la figura. Cada oxígeno carbonílico forma un puente de hidrógeno con el hidrógeno de amida en el cuarto residuo hacia el C-terminal de la cadena de polipéptido. Los puentes de hidrógeno son aproximadamente paralelos al eje mayor de la hélice. Nótese que los grupos carbonilo apuntan hacia el C-terminal. En una hélice α ideal, las posiciones equivalentes se repiten cada 0.54 nm (el paso de la hélice), cada residuo de aminoácido avanza la hélice en 0.15 nm a lo largo de la hélice (el ascenso), y hay 3.6 residuos de aminoácidos por cada vuelta. En una hélice derecha, la columna vertebral gira en dirección de las manecillas del reloj, vista desde su N-terminal, a lo largo del eje. Si el lector imagina que la hélice derecha es una escalera de caracol, al bajar por ella estará girando hacia la derecha. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

mente 3 2/3 de residuo: un grupo carbonilo, tres unidades N—C_α—C y un nitrógeno). La mayor parte de las hélices α está ligeramente distorsionada en las proteínas, pero en general tienen entre 3.5 y 3.7 residuos por vuelta.

Dentro de una hélice α, cada residuo con oxígeno carbonílico (residuo n) de la columna vertebral del polipéptido está unido mediante puente de hidrógeno con el hidrógeno de la amida en la columna vertebral del cuarto residuo siguiendo la dirección hacia el C-terminal (residuo $n + 4$). (Los tres grupos amino en un extremo de la hélice y los tres grupos carbonilo en el otro extremo carecen de receptores de puente de hidrógeno dentro de la hélice). Cada puente de hidrógeno cierra un asa que contiene 13 átomos —el oxígeno carbonílico, 11 átomos de columna vertebral y el hidrógeno de amida. Esta hélice α también puede llamarse hélice 3.6_{13}, de acuerdo con su paso y el tamaño del asa unida con puente de hidrógeno. Los puentes de hidrógeno que estabilizan a la hélice son casi paralelos al eje longitudinal de la hélice.

Los ángulos ϕ y ψ de cada residuo en una hélice α son similares. Se agrupan en torno a una región estable del diagrama de Ramachandran en un valor de ϕ de –57° y un valor de ψ de –47° (figura 4.9). La semejanza de estos valores es lo que confiere una estructura regular y repetitiva a la hélice α. Los puentes de hidrógeno intermoleculares entre los residuos n y $n + 4$ tienden a "trabar" la rotación en torno a los enlaces N—Cα y Cα—C, restringiendo a los ángulos ϕ y ψ a un intervalo relativamente angosto.

Figura 4.11 ▲
Vista de una hélice α derecha. La cinta representa la forma de la columna vertebral del polipéptido. Todas las cadenas laterales, representadas con modelos de bolas y palillos, se proyectan hacia fuera desde el eje de la hélice. Este ejemplo es de los residuos Ile-355 (abajo) hasta Gly-365 (arriba) de la deshidrogenasa alcohólica de hígado de caballo. No se muestran algunos átomos de hidrógeno. [PDB 1ADF].

Un solo puente de hidrógeno intrahelicoidal no suministraría estabilidad estructural apreciable, pero el efecto acumulativo de varios puentes de hidrógeno dentro de una hélice α estabiliza esta conformación. Los puentes de hidrógeno entre los residuos de aminoácido tienen estabilidad especial en el interior hidrofóbico de una proteína, donde las moléculas de agua no entran y en consecuencia no pueden competir en la formación de puentes. En una hélice α, todos los grupos carbonilo apuntan hacia el C-terminal. Ya que cada grupo peptídico es polar y todos los puentes de hidrógeno apuntan en la misma dirección, toda la hélice es un dipolo con un N-terminal positivo y un C-terminal negativo.

Las cadenas laterales de los aminoácidos en una hélice α apuntan desde el cilindro de la hélice hacia afuera (figura 4.11). La estabilidad de una hélice α se ve influida por la identidad de las cadenas laterales. En conformaciones helicoidales α se encuentran algunos residuos de aminoácido con más frecuencia que otros. Por ejemplo, la alanina cuenta con una cadena lateral pequeña y sin carga que presenta correcta cabida en la conformación helicoidal α. Los residuos de alanina son frecuentes en las hélices α de toda clase de proteínas. En contraste, la tirosina y la asparagina, con sus cadenas laterales voluminosas, son menos comunes en las hélices α. La glicina, cuya cadena lateral es un solo átomo de hidrógeno, desestabiliza a las estructuras helicoidales α porque la rotación en torno a su carbono α está muy restringida. La prolina es el residuo menos frecuente en una hélice α por su cadena lateral cíclica rígida, que altera la conformación helicoidal derecha, porque ocupa espacio que de otra forma ocuparía un residuo vecino de la hélice. Además, como carece de un átomo de hidrógeno en su nitrógeno de amida, la prolina no puede participar totalmente en los puentes de hidrógeno intrahelicoidales. Por estas razones los residuos de prolina se encuentran con más frecuencia en los extremos de las hélices α que en el interior.

Las proteínas varían en su contenido de hélices α. En algunas, la mayor parte de los residuos se encuentra en hélices α. Otras proteínas contienen muy poca estructura helicoidal α. El contenido promedio de hélices α en las proteínas que se han examinado es 26%. La longitud de una hélice en una proteína puede ir desde unos 4 o 5 residuos hasta más de 40, pero el promedio es unos 12.

Muchas hélices α muestran aminoácidos hidrofílicos en una cara del cilindro de la hélice y aminoácidos hidrofóbicos en la cara opuesta. Es fácil comprobar la naturaleza anfipática de la hélice cuando se traza la secuencia de aminoácidos como una espiral, llamada rueda helicoidal. Por ejemplo, la hélice α de la figura 4.11 se puede trazar como rueda helicoidal que representa a la hélice vista a lo largo de su eje. Como hay 3.6 residuos por vuelta de la hélice, los residuos se grafican cada 100° a lo largo de la espiral (figura 4.12). Nótese que la hélice es una rosca derecha y termina por un residuo de glicina en el extremo C-terminal. Los residuos hidrofílicos (asparagina, glutamato, aspartato y arginina) tienden a agruparse en un lado de la rueda helicoidal.

Con frecuencia, las hélices anfipáticas se localizan en la superficie de una proteína con las cadenas laterales hidrofílicas expuestas hacia afuera (hacia el solvente acuoso) y las cadenas laterales hidrofóbicas invertidas hacia adentro (hacia el interior hidrofóbico). Por ejemplo, la hélice de las figuras 4.11 y 4.12 está en la superficie de la enzima

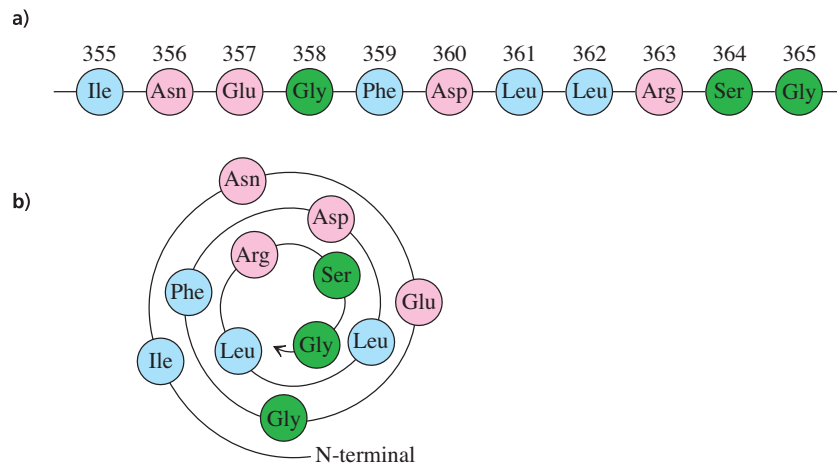
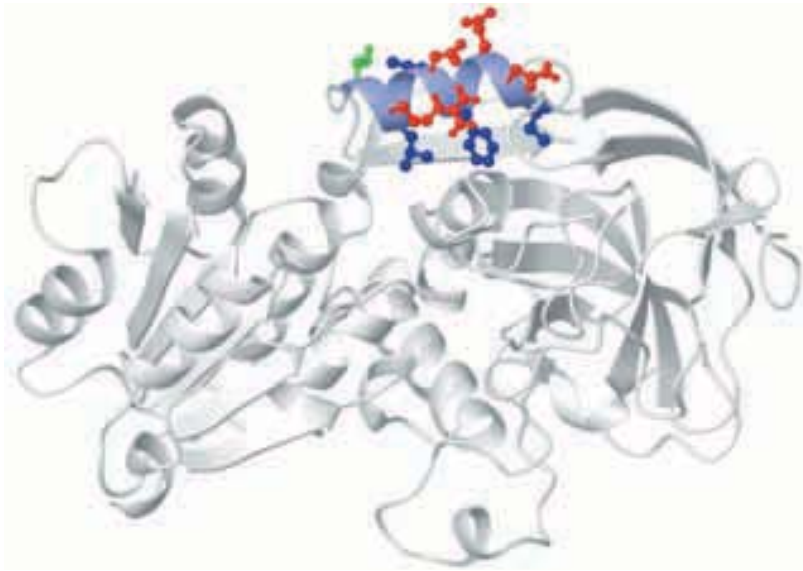


Figura 4.12 ▶
Hélice en la deshidrogenasa alcohólica de hígado de caballo. Los residuos muy hidrofóbicos están en azul, los menos hidrofóbicos están en verde, y los residuos muy hidrofílicos están en rosa. **a)** Secuencia de aminoácidos. **b)** Diagrama de rueda helicoidal. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).



◀ Figura 4.13
Deshidrogenasa alcohólica de hígado de caballo. Se destaca la hélice α anfipática. Las cadenas laterales de los residuos muy hidrofóbicos se representan en azul, los residuos menos hidrofóbicos son verdes, y los residuos con carga se muestran en rojo. Nótese que las cadenas laterales de los residuos hidrofóbicos se dirigen hacia el interior de la proteína, y que las cadenas laterales de los residuos cargados quedan expuestas en la superficie. [PDB 1ADF]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

hepática alcohol deshidrogenasa, soluble en agua, con las cadenas laterales de los residuos primero, quinto y octavo (isoleucina, fenilalanina y leucina, respectivamente) sepultados en el interior de la proteína (figura 4.13).

Hay muchos ejemplos de dos hélices α anfipáticas que interactúan y producen una estructura extendida de resorte-resorte donde las dos hélices α se abrazan entre sí con sus caras hidrofóbicas en contacto y sus caras hidrofílicas expuestas al solvente. Una estructura común en las proteínas enlazantes de ADN se llama cierre (*zíper*) de leucina (figura 4.14). El nombre indica que dos hélices α están "cerradas" entre sí por las interacciones hidrofóbicas de los residuos de leucina (y otros residuos hidrofóbicos) en un lado de una hélice anfipática. En las estructuras de cierre de leucina, las dos hélices α sólo muestran una tendencia ligera a enrollarse una en torno a la otra. Los extremos de las hélices forman la región de la proteína que enlaza al ADN.

Algunas proteínas contienen unas pocas regiones cortas de una hélice 3_{10}. Como la hélice α, la hélice 3_{10} es derecha. El oxígeno carbonílico de una hélice 3_{10} forma un puente de hidrógeno con el hidrógeno de la amida del residuo $n + 3$ (en comparación con el residuo $n + 4$ de una hélice α), por lo que la hélice 3_{10} tiene una estructura de anillo con puentes de hidrógeno más apretada que la hélice α —10 átomos en vez de 13— y cuenta con menos residuos por vuelta (3.0) y un paso mayor (0.60 nm). La hélice 3_{10} es un poco menos estable que la hélice α por impedimentos estéricos y la horrible geometría de sus puentes de hidrógeno. Cuando hay una hélice 3_{10}, en general tiene pocos residuos de longitud y con frecuencia es la última vuelta del extremo C-terminal de una hélice α. Debido a su geometría diferente, los ángulos ϕ y ψ de los residuos en una hélice 3_{10} ocupan una región diferente del diagrama de Ramachandran en comparación con los residuos de una hélice α (figura 4.9).

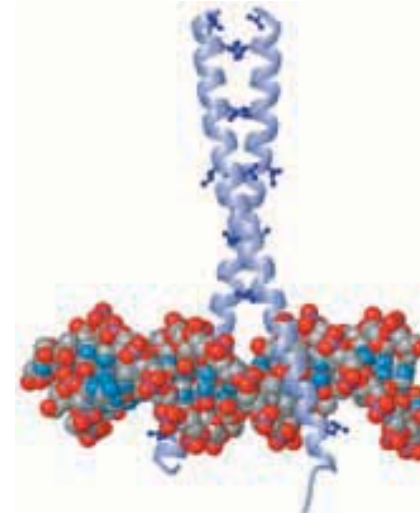


Figura 4.14 ▲
Región de cremallera en leucina de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), proteína GCN4 unida al ADN. La GCN4 es una proteína reguladora de trascripción que se une con secuencias específicas de ADN. La región de unión con ADN consiste en dos hélices α anfipáticas, una de cada una de las dos subunidades de la proteína. Las cadenas laterales de los residuos de leucina se muestran en un azul más oscuro que la cinta. En esta figura sólo se muestra la región de la cremallera en la proteína. [PDB 1YSA]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

4.5 Hebras β y láminas β

La otra estructura secundaria común se llama estructura β, una clase que incluye a hebras β y láminas β. Las **hebras β** son partes de la cadena polipeptídica que se encuentran casi totalmente extendidas. Cada residuo en una hebra β ocupa de 0.32 a 0.34 nm de la longitud total, en contraste con la espiral compacta de una hélice α, donde cada residuo corresponde a 0.15 nm de la longitud general. Cuando se ordenan varias hebras β lado a lado forman **láminas β**, estructura que propusieron originalmente Pauling y Corey cuando desarrollaban el modelo teórico de la hélice α.

Las proteínas casi nunca contienen hebras β aisladas porque la estructura en sí no es mucho más estable que otras conformaciones. Sin embargo, las láminas β se hallan estabilizadas por puentes de hidrógeno entre los oxígenos carbonílicos y los hidrógenos

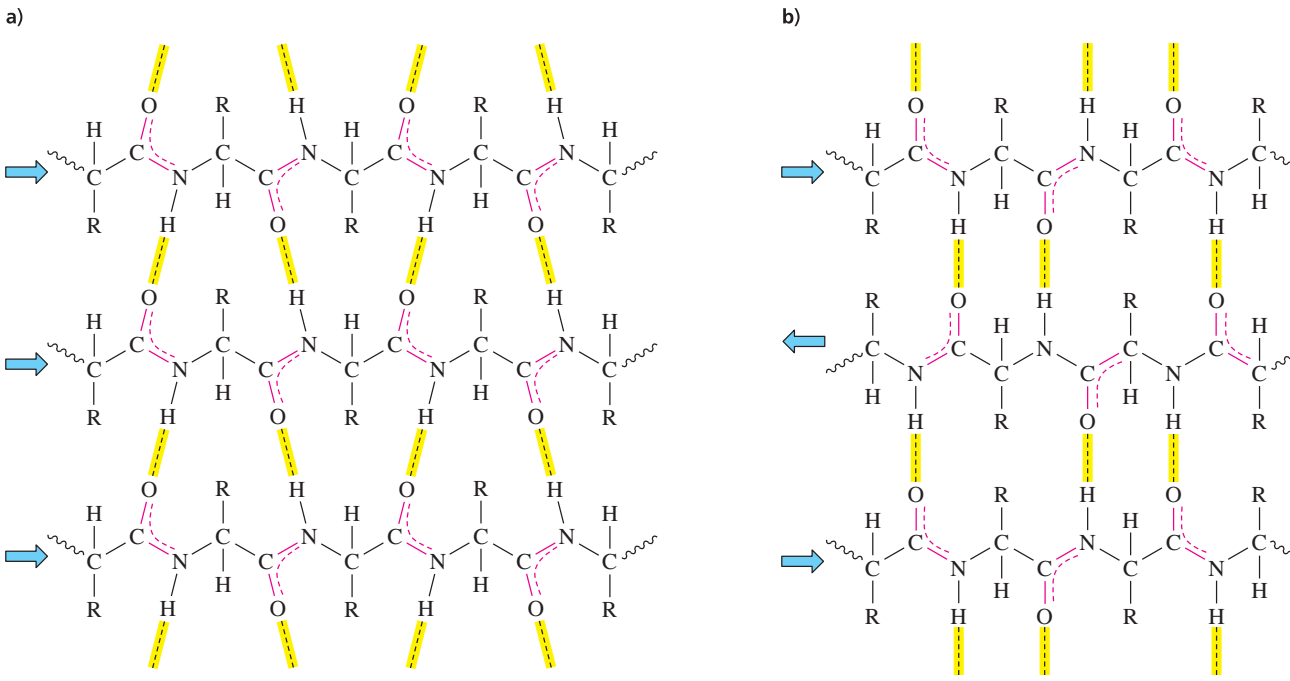


Figura 4.15 ▲
Láminas β. Las flechas indican la dirección desde el N hasta el C-terminales de la cadena del péptido. **a)** Lámina β paralela. Los puentes de hidrógeno están a distancias uniformes, pero están inclinados. **b)** Lámina β antiparalela. Los puentes de hidrógeno son esencialmente perpendiculares a las cadenas β y el espacio entre los pares unidos por puentes de hidrógeno es ancho y angosto en forma alternada. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

de amida en hebras β adyacentes. Así, en las proteínas, las regiones de estructura β casi siempre se encuentran en láminas. Las hebras β con puentes de hidrógeno pueden estar en cadenas separadas de polipéptidos o en diferentes segmentos de la misma cadena. Las hebras β en una lámina pueden ser paralelas (con la misma dirección de N a C-terminal) (figura 4.15a) o antiparalelas (con direcciones opuestas de N a C-terminal) (figura 4.15b). Cuando las hebras β son antiparalelas, los puentes de hidrógeno son casi perpendiculares a las cadenas extendidas del polipéptido. Nótese que en la lámina β antiparalela los átomos de oxígeno carbonílico y los de hidrógeno de amida de un residuo forman puentes de hidrógeno con el hidrógeno de amida y el oxígeno carbonílico de un solo residuo en la otra hebra. En el ordenamiento paralelo, los puentes de hidrógeno no son perpendiculares a las cadenas extendidas y cada residuo forma puentes de hidrógeno con los grupos carbonilo y amida de dos residuos diferentes en la cadena adyacente.

Las láminas paralelas son menos estables que las antiparalelas, quizá porque los puentes de hidrógeno están distorsionados en el ordenamiento paralelo. A veces, a la lámina β se le llama **lámina β plegada** ya que los grupos peptídicos planos se encuentran entre sí formando ángulos como en el plisado de un acordeón. El resultado de los ángulos de enlace entre grupos de péptidos es que las cadenas laterales de aminoácido apuntan arriba y abajo, alternadamente, del plano de la lámina. Una lámina β típica contiene desde dos hasta 15 hebras β individuales. Cada hebra está constituida por un promedio de seis residuos de aminoácido.

Algunas proteínas son láminas β casi en su totalidad, pero la mayor parte de las proteínas tiene un contenido mucho menor de hebras β. Como en las hélices α, la cara de una lámina β que se proyecta hacia el interior de la proteína tiende a ser hidrofóbica y la que lo hace hacia el solvente tiende a ser hidrofílica. Las láminas β paralelas suelen ser hidrofóbicas en ambas caras y están sepultadas en el interior de una proteína.

En la mayor parte de las proteínas, las hebras β que forman las lámina β están torcidas y la lámina está distorsionada y pandeada. La vista tridimensional de la lámina β de la ribonucleasa A (figura 4.3) muestra un aspecto más realista de lámina β que las estructuras idealizadas de la figura 4.15. En la figura 4.16 se ven dos hebras de una

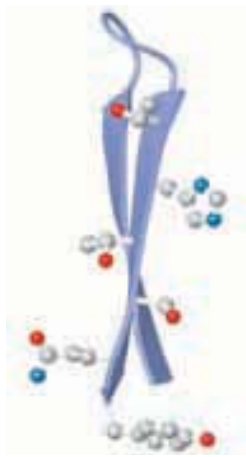


Figura 4.16 ▲
Dos hebras de una lámina β antiparalela de neuraminidasa del virus A de influenza. Sólo se muestran las cadenas laterales de la hebra β delantera. Las cadenas laterales se alternan de uno a otro lado de la hebra β. Ambas hebras tienen un giro derecho. [PDB 1BJI]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

lámina β. Nótese que las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos en la hebra delantera se proyectan hacia la izquierda y la derecha en forma alternada (es decir, arriba y abajo) de la hebra β, como se describió arriba. En forma típica, las hebras β se tuercen un poco hacia la derecha, esto es, se tuercen en el sentido de las manecillas del reloj, vistas a lo largo de la hebra.

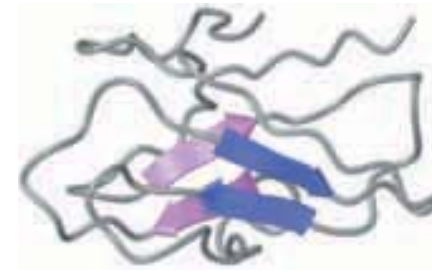
Los ángulos ϕ y ψ de los enlaces en una hebra β están restringidos a un intervalo de valores que ocupa una región grande y estable en la esquina superior izquierda del diagrama de Ramachandran. Los ángulos típicos de residuos en hebras paralelas y antiparalelas no son idénticos (figura 4.9). Ya que la mayor parte de las hebras β está torcida, los ángulos ϕ y ψ tienen un intervalo mayor de valores que los que se ven en la hélice α, más regular.

Aunque suele imaginarse que las láminas β son ejemplos de estructura secundaria, hablando en sentido estricto ello no es correcto. En muchos casos, las hebras β individuales están en regiones diferentes de la proteína y sólo se juntan para formar la lámina β cuando la proteína adopta su conformación terciaria final. En algunos casos, la estructura cuaternaria de una proteína origina una lámina β grande.

En la sección anterior se explicó que las hélices α anfipáticas tienen cadenas laterales hidrofóbicas que se proyectan hacia afuera, en un lado de la hélice. Es el lado que interactúa con el resto de la proteína, formando una serie de interacciones hidrofóbicas que ayudan a estabilizar la estructura terciaria. En el caso de las láminas β, las cadenas laterales se proyectan alternadamente arriba y abajo del plano de las hebras β. En la superficie pueden consistir en cadenas laterales hidrofóbicas que permiten que la lámina β esté arriba de otros residuos hidrofóbicos en el interior de la proteína.

Un ejemplo de esas interacciones hidrofóbicas entre dos láminas β se ve en la estructura de la proteína de recubrimiento de granos de polen de pasto (figura 4.17a). Esta proteína es el principal alergeno que afecta a personas alérgicas a los granos de polen de pasto. Una superficie de cada lámina β contiene cadenas laterales hidrofóbicas y la superficie opuesta presenta cadenas laterales hidrofílicas. Las dos superficies hidrofóbicas interactúan y forman el interior hidrofóbico de la proteína, mientras que las superficies hidrofílicas quedan expuestas al solvente, como se ve en la figura 4.17b. Es un ejemplo de un emparedado (o *sándwich*) β, uno de varios ordenamientos de elementos estructurales secundarios que se describirán con más detalle en la sección acerca de la estructura terciaria (sección 4.7).

a)



b)

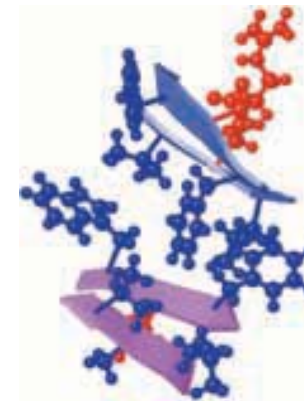


Figura 4.17 ▲
Estructura de PHL P2 de polen de pasto Timothy (*Phleum pratense*). **a)** Las dos cortas láminas de doble hebra β antiparalelas se destacan en azul y púrpura para mostrar su orientación dentro de la proteína. **b)** Estructura de emparedado β en una orientación distinta mostrando residuos hidrofóbicos (azul) y polares (rojo). Varias interacciones hidrofóbicas conectan las dos láminas β. [PDB 1BMW]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

4.6 Asas y giros

En una hélice α o en una hebra β, los residuos consecutivos tienen una conformación similar que se repite en toda la estructura. También, las proteínas presentan tramos de estructura tridimensional no repetitiva. La mayor parte de esas regiones de estructura secundaria se puede caracterizar como rizos (o asas) y giros (o vueltas) porque causan cambios de dirección en la columna vertebral del polipéptido. Como en las regiones repetitivas, las conformaciones de los grupos peptídicos en las regiones no repetitivas están restringidas. Tienen valores de ϕ y de ψ que en general están bien en el interior de las regiones permitidas en el diagrama de Ramachandran, y con frecuencia están cerca de los valores de residuos que forman hélices α o hebras β.

Las asas y los giros unen a hélices α y hebras β y permiten que la cadena de polipéptido se doble sobre sí misma para producir la forma tridimensional compacta que se ve en la estructura nativa. Hasta la tercera parte de los residuos de aminoácidos en una proteína típica está formada por esas estructuras no repetitivas. Las **asas** contienen con frecuencia residuos hidrofílicos y se suelen encontrar en las superficies de las proteínas, donde están expuestas al solvente y forman puentes de hidrógeno con el agua. Como se ve en muchos ejemplos de este capítulo, algunas asas consisten en numerosos residuos de estructura no repetitiva extendida. Más o menos 10% de los residuos se puede encontrar en dichas regiones.

Las asas que sólo contienen pocos (hasta cinco) residuos se llaman **giros** si causan un cambio abrupto en la dirección de una cadena de polipéptidos. Los tipos más comunes de giros bruscos se llaman **giros inversos** o **giros β** porque con frecuencia conectan hebras β antiparalelas diferentes. (Recuérdese que para crear una lámina β el polipéptido debe doblarse de tal manera que dos o más regiones de hebra β queden adyacentes entre sí, como muestra la figura 4.16).

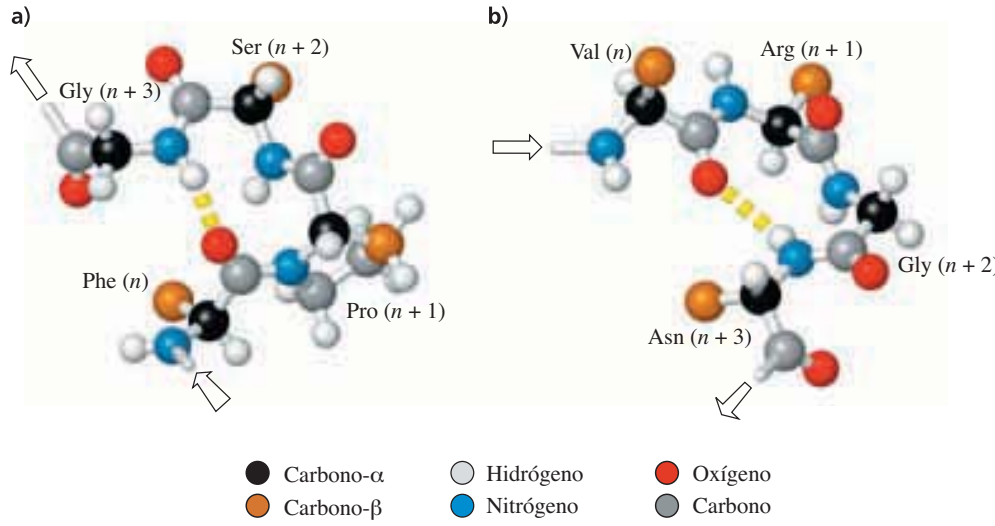


Figura 4.18 ▲
Giros inversos. **a)** Giro tipo I β. La estructura se halla estabilizada por un puente de hidrógeno entre el oxígeno carbonílico del primer residuo N-terminal (Phe) y el hidrógeno de amida del cuarto residuo (Gly). Obsérvese el residuo de prolina en la posición $n + 1$. **b)** Giro tipo II β. También está estabilizado por un puente de hidrógeno entre el oxígeno carbonílico del primer residuo N-terminal (Val) y el hidrógeno de amida del cuarto residuo (Asn). Obsérvese que el residuo de glicina está en la posición $n + 2$ [PDB 1AHL (neurotoxina de anémona marina gigante)]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

Hay dos tipos comunes de giro β que se designan tipo I y tipo II. Ambos contienen cuatro residuos de aminoácidos y los estabilizan puentes de hidrógeno entre el oxígeno carbonílico del primer residuo y el hidrógeno de amida del cuarto residuo (figura 4.18). Los dos tipos, el I y el II, producen un cambio abrupto (en general de unos 180°) en la dirección de la cadena de polipéptido. En los giros tipo II, el tercer residuo es glicina 60% de las veces. El segundo residuo en ambos tipos de giros es de prolina, con frecuencia.

En las proteínas se comprueban varias estructuras de giro. Todas disponen de puentes de hidrógeno internos que estabilizan la estructura y es la causa de que se puedan considerar como una forma de estructura secundaria. En muchas proteínas los giros forman una parte importante de la estructura. Algunos de los enlaces en los residuos de giro tienen ángulos ϕ y ψ que exceden las regiones "permitidas" de un diagrama típico de Ramachandran (figura 4.9). Esto sucede en especial en los residuos que están en la tercera posición de los giros tipo II, donde hay un cambio abrupto en la dirección de la columna vertebral. Ya que con frecuencia este residuo es glicina, los ángulos de enlace pueden adoptar valores entre límites más amplios sin causar choques estéricos entre los átomos de la cadena lateral y los átomos de la columna vertebral. En general, los diagramas de Ramachandran sólo muestran las regiones permitidas para todos los residuos, a excepción de la glicina, y es la causa de que los ángulos de rotación de los giros tipo II parezcan estar en una área restringida.

4.7 Estructura terciaria de las proteínas

La estructura terciaria se debe al plegamiento de un polipéptido (que puede tener ya algunas regiones de hélice α y de estructura β) para formar una estructura tridimensional empacada en forma apretada. Una propiedad importante de la estructura terciaria es que los residuos de aminoácidos alejados en la estructura primaria se acercan entre sí y permiten interacciones entre sus cadenas laterales. Mientras que la estructura secundaria está estabilizada por puentes de hidrógeno entre los hidrógenos de amida y oxígenos carbonílicos de la columna vertebral del polipéptido, la estructura terciaria se halla estabilizada en especial por interacciones no covalentes (casi siempre el efecto hidrofóbico)

entre las cadenas laterales de residuos de aminoácidos. También los puentes disulfuro, aunque son covalentes, son elementos de la estructura terciaria (no son parte de la estructura primaria porque sólo se forman después que la proteína se dobla).

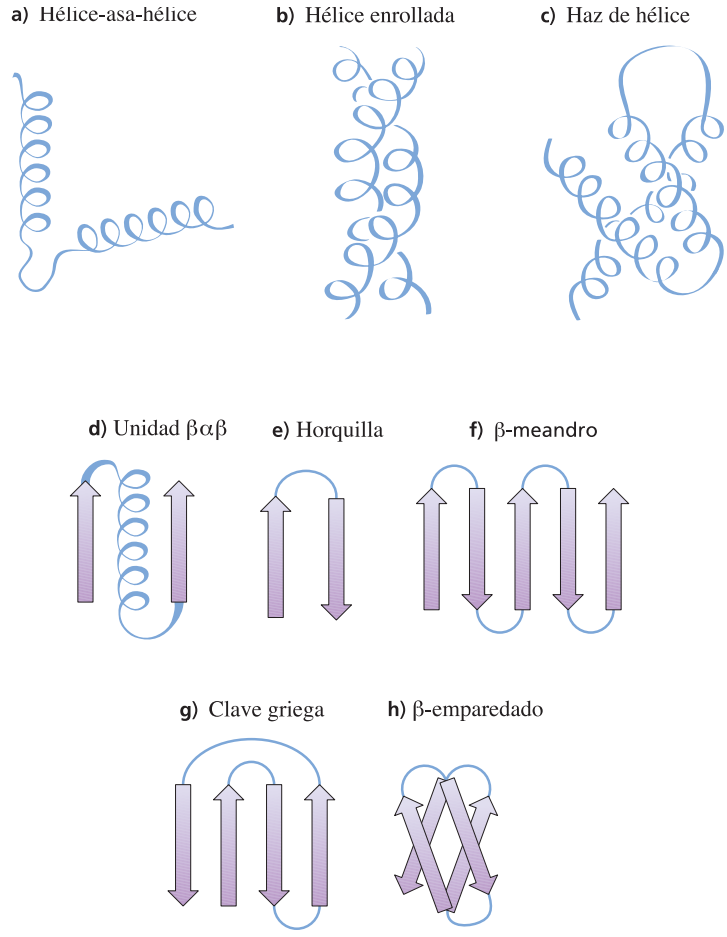
A. Estructuras supersecundarias

Las estructuras supersecundarias, o **motivos**, son combinaciones reconocibles de hélices α, hebras β y giros que aparecen en diversas proteínas. A veces los motivos se relacionan con determinada función, aunque los motivos de estructura similar pueden tener funciones distintas en proteínas diferentes. En la figura 4.19 se muestran algunos motivos comunes.

Uno de los motivos más sencillos es la hélice-asa-hélice (figura 4.19a). Esta estructura se presenta en varias proteínas que unen calcio. En el asa de esas proteínas los residuos de glutamato y aspartato forman parte del sitio de unión al calcio. En ciertas proteínas que se unen al ADN, una versión de esta estructura supersecundaria se llama hélice-giro-hélice porque los residuos que unen a las hélices forman una vuelta inversa. En esas proteínas, los residuos de las hélices α se unen con ADN.

El motivo rizado-rizo consiste en dos hélices α anfipáticas que interaccionan a través de sus orillas hidrofóbicas (figura 4.19b), como en el ejemplo de la cremallera de leucina (figura 4.14). Se pueden asociar varias hélices α para formar un haz de hélices (figura 4.19c). En este caso, las hélices α individuales tienen orientaciones opuestas, mientras que son paralelas en el motivo rizado-rizo.

La unidad $\beta\alpha\beta$ consiste en dos hebras β paralelas unidas a una hélice α intermedia por dos asas (figura 4.19d). La hélice une el extremo C-terminal de una hebra β con el



◀ Figura 4.19
Motivos comunes. En las proteínas plegadas, las hélices α y las hebras β suelen estar conectadas por asas y giros para formar estructuras supersecundarias que aquí se muestran como representaciones bidimensionales. Las flechas indican la dirección desde el N hasta el C terminales de la cadena de péptido.

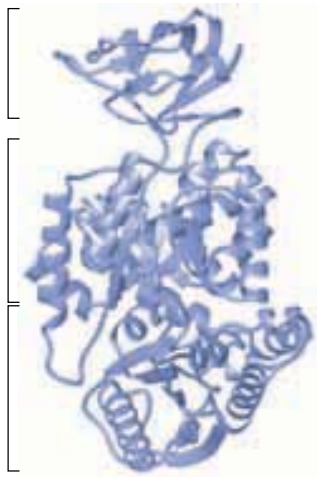


Figura 4.20 ▲
Cinasa de piruvato del gato (*Felis domesticus*). La cadena principal de polipéptido en esta enzima común se pliega en tres dominios distintos, que se indican con corchetes. [PDB 1PKM].

extremo N-terminal de la siguiente y con frecuencia es paralela a las dos hebras. Una horquilla consiste en dos hebras β adyacentes y antiparalelas conectadas por un giro β (figura 4.19e). (En la figura 4.16 se ve un ejemplo de motivo de horquilla).

El motivo β-meandro (figura 4.19f) es una lámina β antiparalela formada por hebras β en secuencia unidas por asas o giros. En el meandro β, el orden de hebras en la lámina β es el mismo que su orden en la secuencia de la cadena polipeptídica. La lámina puede contener una o más horquillas pero, en forma más típica, las hebras están unidas por asas más grandes. El motivo de clave griega toma su nombre de un diseño de la cerámica griega clásica. Es un motivo de lámina β que une cuatro hebras β antiparalelas, de tal modo que las hebras 3 y 4 forman las orillas externas de la lámina y las hebras 1 y 2 están a la mitad de la lámina. El motivo β emparedado se forma cuando hebras o láminas β se apilan una sobre otra (figura 4.19h). La figura muestra un ejemplo de un emparedado β donde las hebras β están conectados por asas y giros cortos, pero también se pueden formar emparedados β por interacción de dos láminas β en distintas regiones de la cadena polipeptídica, como se ve en la figura 4.17.

B. Dominios

Hay muchas proteínas que están formadas por varias unidades compactas, discretas, plegadas en forma independiente llamadas **dominios**. Los dominios pueden consistir en combinaciones de motivos. El tamaño de un dominio varía desde unos 25 a 30 residuos de aminoácidos hasta más de 300. En la figura 4.20 se muestra un ejemplo de una proteína con varios dominios. Obsérvese que cada dominio es una unidad compacta distinta, que consiste en varios elementos con estructura secundaria. En general, los dominios están unidos por asas, pero también se unen entre sí mediante interacciones débiles formadas por las cadenas laterales de aminoácidos en la superficie de cada dominio. En el caso de la piruvato cinasa, el dominio superior en la figura 4.20 contiene los residuos 116 a 119; el dominio central contiene los residuos 1 a 115 más el 220 al 388, y el dominio inferior contiene los residuos 389 a 530. En general, los dominios consisten en un tramo contiguo de residuos de aminoácidos, como en los dominios de arriba y de abajo de la piruvato cinasa, pero en algunos casos un solo dominio puede contener dos o más regiones diferentes de la cadena polipetídica, como en el dominio intermedio.

La conservación evolutiva de la estructura de la proteína es una de las observaciones más importantes que se ha demostrado al estudiar las proteínas, durante las últimas décadas. Esta conservación se ve con más facilidad en las proteínas homólogas de un solo dominio procedentes de especies diferentes. Por ejemplo, en el capítulo 3 se examinó la similitud en las secuencias del citocromo *c* y se indicó que las semejanzas en la estructura primaria se podrían usar para construir un árbol filogenético que mostrara las relaciones evolutivas de las proteínas procedentes de especies diferentes (sección 3.11). Como

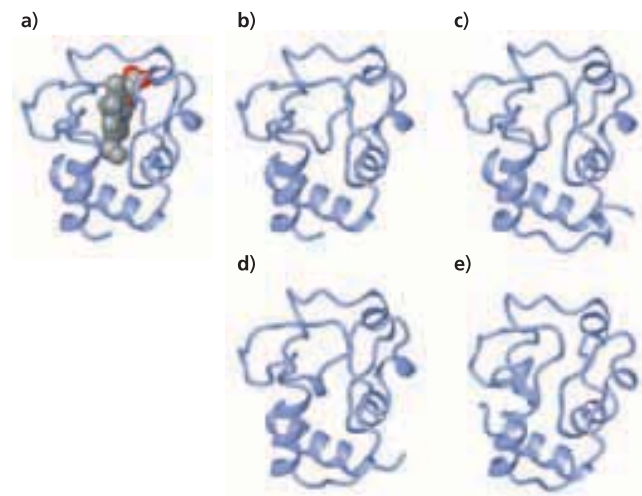


Figura 4.21 ▶
Citocromo *c*. **a)** Citocromo *c* de atún (*Thunnus alalunga*) unido a hemo [PDB 5CYT]. **b)** Cadena de polipéptido de citocromo *c* de atún. **c)** Citocromo *c* de arroz (*Oryza sativa*) [PDB 1CCR]. **d)** Citocromo *c* de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) [PDB 1YCC]. **e)** Citocromo *c* bacteriano (*Rhodopila globiformis*) [PDB 1HRO].

es de esperarse, las estructuras terciarias de los citocromos *c* también se conservan mucho (figura 4.21). El citocromo *c* es un ejemplo de proteína que contiene un grupo prostético hemo. La conservación de la estructura proteínica refleja su interacción con el hemo y su función conservada de proteína de transporte de electrones en diversas especies.

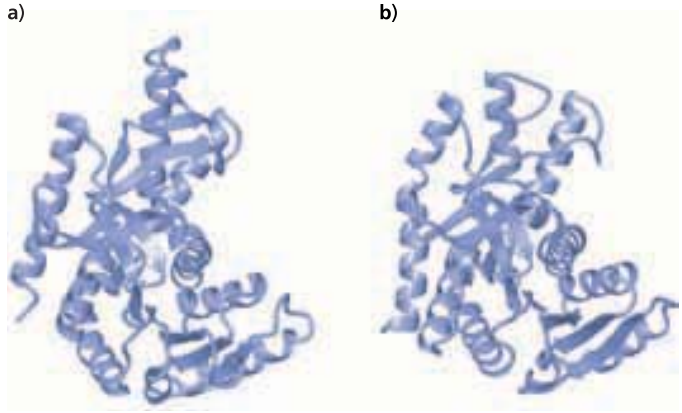
Algunas estructuras de dominio se presentan en muchas proteínas diferentes, mientras que otras son exclusivas. En general, las proteínas se pueden agrupar en familias de acuerdo con las semejanzas en estructuras de dominio y en secuencia de aminoácidos. Todos los miembros de una familia descienden de una proteína ancestral común. Algunos bioquímicos creen que sólo puede haber unos pocos miles de familias, sugiriendo que todas las proteínas modernas descienden de sólo unos pocos miles de proteínas que había en los organismos más primitivos que vivieron hace 3 mil millones de años.

La lactato deshidrogenasa y la malato deshidrogenasa son enzimas diferentes que pertenecen a la misma familia de proteínas. Sus estructuras son muy parecidas, como se ve en la figura 4.22. No obstante la similitud obvia en la estructura, sólo hay 23% de identidad en las secuencias de esas proteínas. Sin embargo, este grado de semejanza de secuencia tiene la importancia suficiente como para llegar a la conclusión de que las dos proteínas son homólogas. Descienden de un gen ancestral común que se duplicaba hace miles de millones de años, antes del ancestro común de todas las especies actuales de bacterias. Tanto la lactato deshidrogenasa como la malato deshidrogenasa existen en la misma especie y es por ello que son miembros de una familia de proteínas relacionadas. (Las familias contienen proteínas relacionadas que estén presentes en la misma especie. Los citocromos *c* de la figura 4.21 son proteínas homólogas pero, hablando con rigor, no son miembros de una familia de proteínas porque sólo hay una de ellas en cada especie. Las familias de proteínas se originan en eventos de duplicación genética).

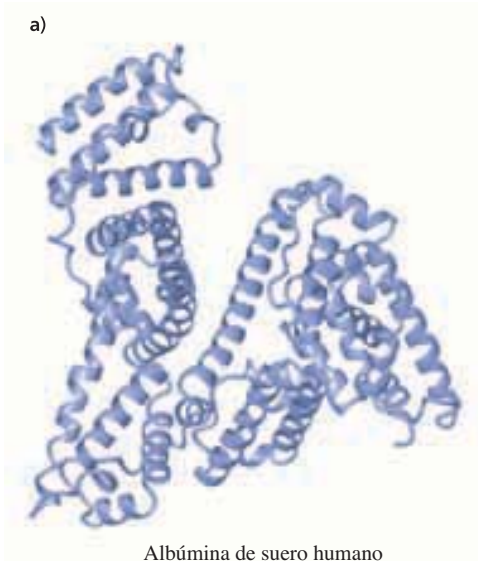
En el recuadro 7.1 se comparan las actividades enzimáticas de las deshidrogenasas de lactato y malato.

Los dominios de proteína pueden clasificarse por sus estructuras. Un esquema de clasificación de uso frecuente agrupa esos dominios en cuatro categorías. La categoría todo α contiene dominios que consisten casi en su totalidad en hélices α y asas. Los dominios todo β sólo contienen láminas β y estructuras no repetitivas que unen a hebras β. Las otras dos categorías contienen dominios que son una mezcla de hélices α y hebras β. Los dominios en la clase α/β tienen estructuras supersecundarias, como el motivo $\beta\alpha\beta$ y otros, en los que se alternan las regiones de hélice α y β en la cadena de polipéptido. En la categoría $\alpha + \beta$, los dominios consisten en grupos locales de hélices α y láminas β donde cada tipo de estructura secundaria se origina en regiones contiguas separadas de la cadena de polipéptido.

Dentro de cada una de las cuatro categorías estructurales principales, los dominios de proteína pueden seguirse agrupando por la presencia de dobleces característicos. Un **doblez** o **pliegue** es una combinación de estructuras secundarias que forman el núcleo de un dominio. La figura 4.23 de la página 102 muestra varios dobleces comunes de dominio. Algunos dominios tienen dobleces que se reconocen con facilidad, como el meandro β, que contiene hebras β antiparalelas unidas por asas de horquilla (figura 4.19f), o por haces de hélices (figura 4.19c). Hay otros dobleces que son más complejos (figura 4.24, página 104).



◀ Figura 4.22
Semejanza estructural de las deshidrogenasas de lactato y malato. **a)** Deshidrogenasa de lactato de *Bacillus stereothermophilus* [PDB 1LDN]. **b)** Deshidrogenasa de malato de *Escherichia coli* [PDB 1EMD].

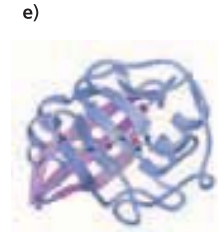


Albúmina de suero humano

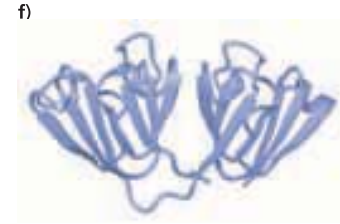
Citocromo b_{562} de *E. coli*

Aciltransferasa de UDP *N*-acetylglucosamine de *E. coli*

Concanavalina A de frijol Jack

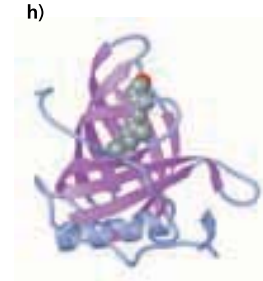


Isomerasa humana de peptidilprolilo *cis/trans*



Gamma cristalina de vaca

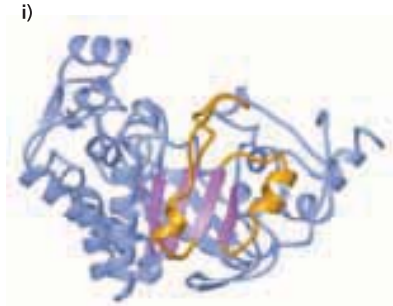
Proteína fluorescente verde de medusa



Proteína enlazante de retinol del cerdo

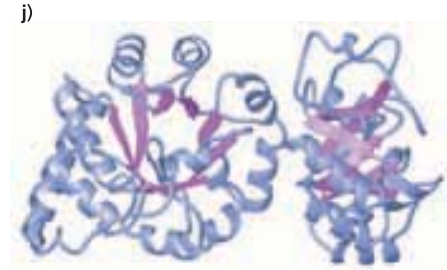
Figura 4.23 ▲
Ejemplos de estructuras terciarias de algunas proteínas. **a)** Albúmina de suero humano (*Homo sapiens*) [PDB 1BJ5] (clase: toda α). Esta proteína tiene varios dominios que consisten en hélices α estratificadas y haces de hélices. **b)** Citocromo b_{562} de *Escherichia coli* [PDB 1QPU] (clase: toda α). Es una proteína enlazante de hemo formada por un solo dominio de haz de cuatro hélices. **c)** Aciltransferasa de UDP *N*-acetilglucosamina de *Escherichia coli* [PDB 1LXA] (clase: toda β). La estructura de esta enzima es un ejemplo clásico de un dominio de hélice β. **d)** Concanavalina A de frijol (*Canavalia ensiformis*) [PDB 1CON] (clase: toda β). Esta proteína enlazante de carbohidrato (lectina) es de dominio único y está formada por un doblez grande en emparedado β. **e)** Isomerasa humana de peptidilprolilo *cis/trans* (*Homo sapiens*) [PDB 1VBS] (clase: toda β). La característica dominante de la estructura es un doblez en emparedado β. **f)** γ-Cristalina de vaca (*Bos taurus*) [PDB 1A45] (clase: toda β). Esta proteína contiene dos dominios en barril β. **g)** Proteína verde fluorescente de medusa (*Aequorea victoria*) [PDB 1GFL] (clase: toda β). Es una estructura de barril β con una hélice β central. Las hebras de la lámina son antiparalelas. **h)** Proteína enlazante de retinol del cerdo (*Sus scrofa*) [PDB 1AQB] (clase: toda β). El retinol se une en el interior de un pliegue de barril β. **i)** Enzima amarilla antigua de levadura de cerveza (*Saccharomyces carlburgensis*) (oxidorreductasa de FMN) [PDB 1OYA] (clase: α/β). El pliegue central es un barril α/β con hebras β paralelas unidas por hélices α. Hay dos regiones de conexión de hélice α resaltadas en amarillo. **j)** Enzima de *Escherichia coli* necesaria en la biosíntesis de triptófano [PDB 1PII] (clase: α/β). Esta enzima bifuncional contiene dos dominios distintos. Cada dominio es un ejemplo de barril α/β. El dominio izquierdo contiene la actividad de la sintetasa de indol-glicerol fosfato y el dominio derecho contiene la actividad de la isomerasa de fosforribosilantranilato.

i)



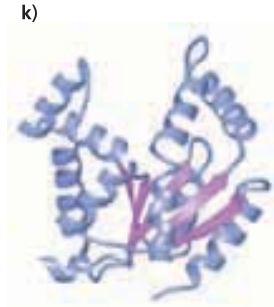
Oxidorreductasa de FMN de levadura (enzima amarilla antigua)

j)



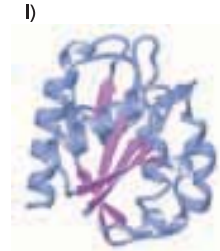
Enzima de biosíntesis de triptófano de *E. coli*

k)



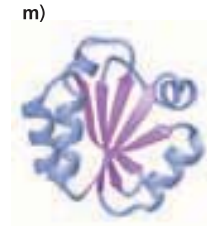
Cinasa de adenililo de cerdo

l)



Flavodoxina de *E. coli*

m)

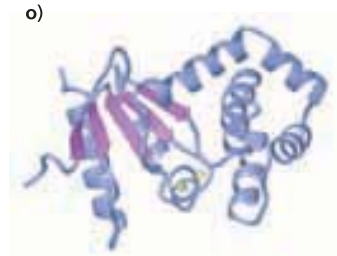


Tiorredoxina humana

n)

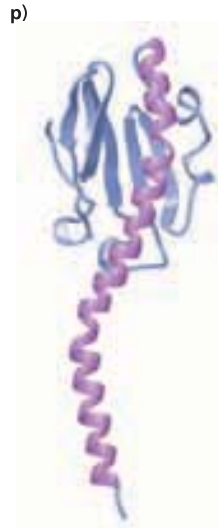
Proteína enlazante de L-arabinosa de *E. coli*

o)



Oxidorreductasa de tiol-disulfuro de *E. coli*

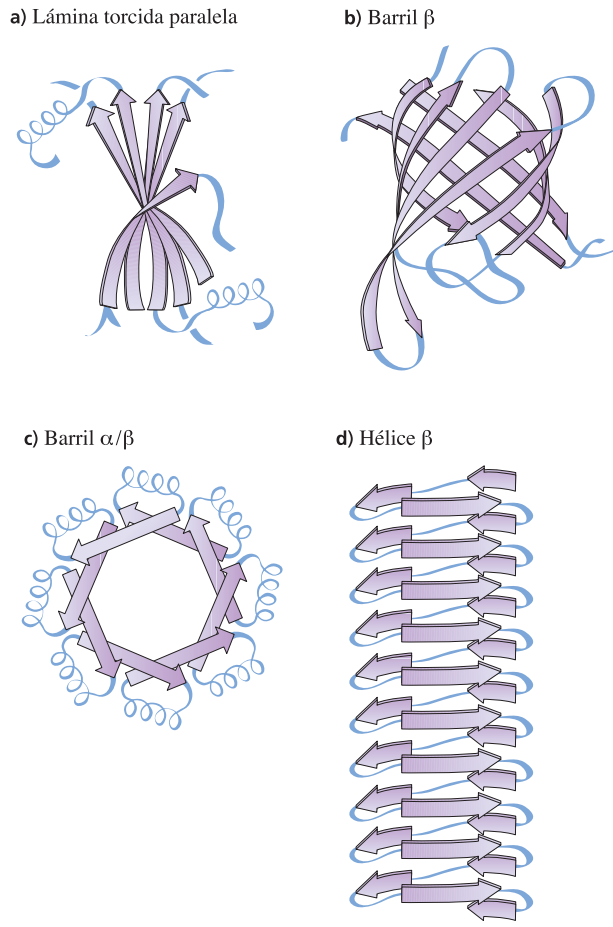
p)



Pilina de *Neisseria gonorrhea*

k) Cinasa de adenilato de cerdo (*Sus scrofa*) [PDB 3ADK] (clase: α/β). Esta proteína de un solo dominio consiste en una lámina paralela β de cinco hebras, con capas de hélices α arriba y abajo de ella. El sustrato se une en la marcada ranura que hay entre las hélices α. **l)** Flavodoxina de *Escherichia coli* [PDB 1AHN] (clase: α/β). El pliegue es una lámina paralela de cinco hebras torcida y rodeada por hélices α. **m)** Tiorredoxina humana (*Homo sapiens*) [PDB 1ERU] (clase: α/β). La estructura de esta proteína se parece mucho a la de la flavodoxina de *E. coli* pero la lámina torcida de cinco hebras en el pliegue de tiorredoxina contiene una sola hebra antiparalela. **n)** Proteína enlazante a L-arabinosa de *Escherichia coli* [PDB 1ABE] (clase: α/β). Es una proteína con dos dominios donde cada dominio se parece a la flavodoxina de *E. coli.* El azúcar L-arabinosa se une en la cavidad que hay entre los dos dominios. **o)** DsbA (oxidorreductasa de tiol-disulfuro-/isomerasa de disulfuro) de *Escherichia coli* [PDB 1A23] (clase: α/β). La característica predominante de esta estructura es una lámina β (casi toda) antiparalela emparedada entre dos hélices α. Se muestran cadenas laterales de cisteína en el extremo de una de las hélices α (los átomos de azufre están en amarillo). **p)** Pilina de *Neisseria gonorrhea* [PDB 2PIL] (clase: $\alpha + \beta$). Este polipéptido es una de las subunidades de las fimbrias en la superficie de la bacteria causante de la gonorrea. Hay dos regiones distintas de la estructura: una lámina β y una hélice α larga. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

Figura 4.24 ▶
Pliegues con dominio común.



C. Estructura y función de los dominios

Es compleja la relación entre estructura y función de un dominio. Con frecuencia, un solo dominio tiene determinada función, como por ejemplo unirse a pequeñas moléculas o catalizar una sola reacción. En las enzimas multifuncionales, cada actividad catalítica puede estar asociada con uno de varios dominios presentes en una sola cadena polipeptídica (figura 4.24j). Sin embargo, en muchos casos el enlazamiento de moléculas pequeñas y la formación del sitio activo de una enzima se llevan a cabo en la interfase entre dos dominios separados. Estas interfases suelen formar grietas, hendiduras y bolsas a las que se puede llegar en la superficie de la proteína. El grado de contacto entre dominios varía de una proteína a otra.

En el capítulo 21 presentaremos especulaciones acerca de la posible relación entre dominios de proteína y organización de genes.

Las formas únicas de las proteínas, con sus penetraciones, interfases entre dominios y otras grietas les permiten efectuar funciones dinámicas al unirse con otras moléculas en forma selectiva y transitoria. Esta propiedad tiene su mejor ejemplo en los enlaces muy específicos de reactivos (sustratos) a sus sitios correspondientes de enlace, o sitios activos, en las enzimas. Ya que hay muchos sitios de unión localizados hacia el interior de una proteína, se encuentran relativamente sin agua. Cuando se enlazan los sustratos, ajustan tan bien que algunas de las pocas moléculas restantes de agua en el sitio de unión son desplazadas.

4.8 Estructura cuaternaria

Muchas proteínas tienen un nivel adicional de organización, llamado estructura cuaternaria. Estructura cuaternaria se refiere a la organización y el ordenamiento de subunidades

en una proteína con múltiples subunidades. Cada subunidad es una cadena polipeptídica aparte. Una proteína con varias subunidades, o de *multisubunidades*, se llama oligómero (las proteínas que sólo tienen una cadena polipeptídica son monómeros). Las subunidades integrantes de cada proteína oligomérica tienen siempre una estequiometría definida y el ordenamiento de las subunidades produce una estructura estable. Las subunidades de una proteína de multisubunidades pueden ser idénticas o diferentes. Cuando las subunidades son diferentes, con frecuencia cada tipo desempeña una función diferente. Un método taquigráfico común para describir las proteínas oligoméricas usa letras griegas para identificar tipos de subunidades y subíndices numéricos para indicar cantidades de subunidades. Por ejemplo, una proteína $\alpha_2\beta\gamma$ contiene dos subunidades llamadas α, una subunidad β y una subunidad γ.

Las subunidades de proteínas oligoméricas se suelen mantener unidas por interacciones débiles no covalentes. Las interacciones hidrofóbicas son las fuerzas principales que intervienen, aunque puede ser que las fuerzas electrostáticas contribuyan al alineamiento adecuado de las subunidades. Ya que las fuerzas entre subunidades suelen ser bastante débiles, las subunidades de una proteína oligomérica se pueden separar, con frecuencia, en el laboratorio. Empero, *in vivo* suelen permanecer firmemente asociadas. En la figura 4.25, en la página 106, se ven ejemplos de varias proteínas de diferentes unidades.

En el caso de la triosa fosfato isomerasa (figura 4.25a) y de la proteasa del VIH (figura 4.25b), las subunidades idénticas se asocian por interacciones débiles que se suscitan entre las cadenas laterales que imperan en forma predominante en las regiones de asas. Interacciones similares son las determinantes de la formación de la proteína de la cápside MS2, formada por un trímero de subunidades idénticas (figura 4.25d). En este caso, las unidades del trímero se ensamblan y forman una estructura más compleja —la partícula bacteriófaga. La enzima HGPRT (figura 4.25e) es un tetrámero formado por la asociación de dos pares de subunidades diferentes, en donde cada subunidad es un dominio reconocible.

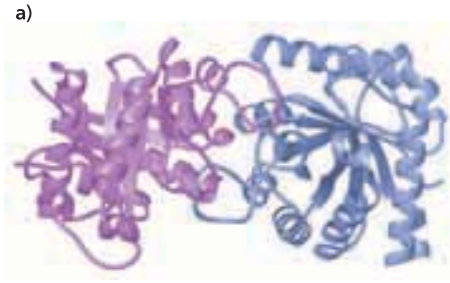
La proteína del canal de potasio (figura 4.25c) es un ejemplo de tetrámetro de subunidades idénticas, donde éstas interactúan y forman una región extendida en la membrana formada por un haz de ocho hélices. Las subunidades no forman dominios separados dentro de la proteína sino que se juntan y forman un solo canal. El fotosistema bacteriano de la figura 4.25f es un ejemplo complejo de una estructura cuaternaria. Tres de las subunidades contribuyen y forman un haz grande de hélices unido a la membrana, mientras que una cuarta subunidad (un citocromo) se asienta en la superficie externa de la membrana.

En el capítulo 15 se describen las estructuras y funciones de fotosistemas bacterianos y vegetales.

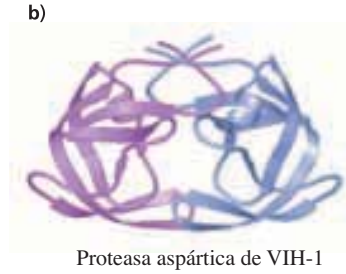
Determinar la composición en subunidades de una proteína oligomérica es un paso esencial de la descripción física de una proteína. En el caso típico, el peso molecular del oligómero nativo se estima mediante cromatografía de filtración en gel y después se determina el peso molecular de cada cadena mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (sección 3.6). Para una proteína que sólo tenga un tipo de cadena, la relación entre los dos valores proporciona la cantidad de cadenas por oligómero.

El hecho de que una gran proporción de proteínas consista en subunidades múltiples se relaciona, probablemente, con varios factores.

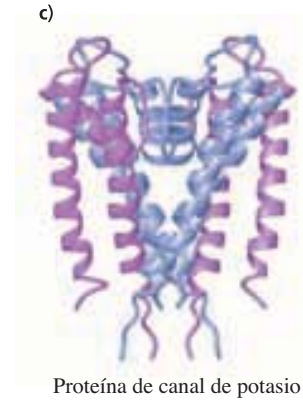
1. Los oligómeros suelen ser más estables que sus subunidades disociadas, lo que parece indicar que la estructura cuaternaria prolonga la duración *in vivo* de una proteína.
2. Los sitios activos de algunas enzimas oligoméricas se forman con residuos procedentes de cadenas de polipéptido adyacentes.
3. Las estructuras tridimensionales de muchas proteínas oligoméricas cambian cuando éstas se unen con ligandos. Tanto las estructuras terciarias de las subunidades como las cuaternarias (es decir, los contactos entre subunidades) se pueden alterar. Algunos cambios son elementos clave en la regulación de la actividad biológica de ciertas proteínas oligoméricas.
4. Proteínas diferentes pueden compartir las mismas subunidades. Como muchas subunidades desempeñan una función definida (por ejemplo, unión con el ligando), la evolución ha favorecido la selección de diferentes combinaciones de subunidades para efectuar funciones relacionadas. Dicha elección es más eficiente que la selección de una proteína monomérica totalmente nueva que duplique parte de la función.



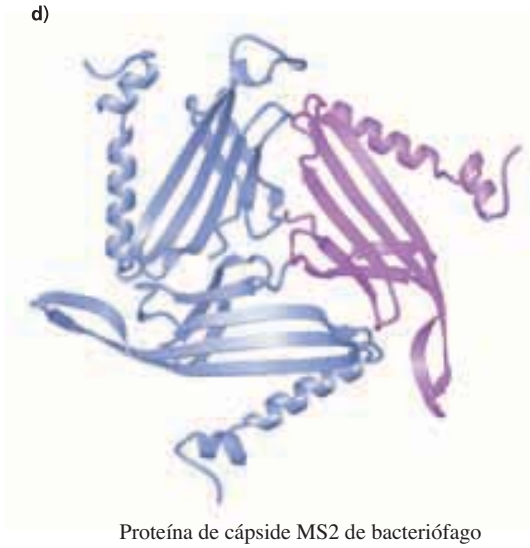
Isomerasa de triosa fosfato de pollo



Proteasa aspártica de VIH-1

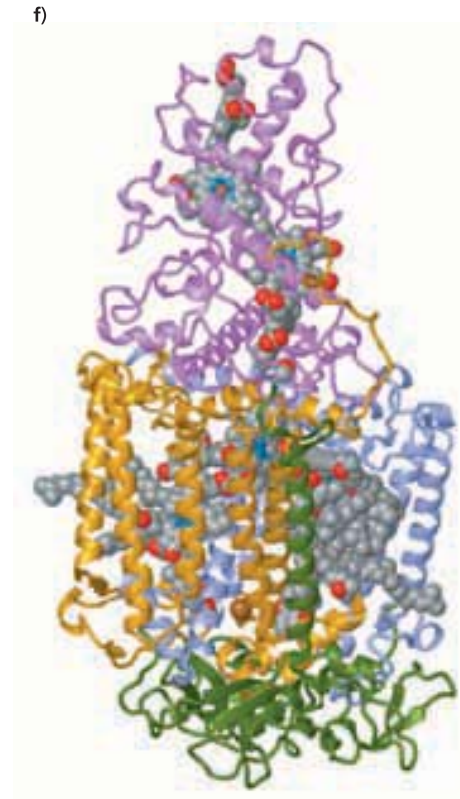


Proteína de canal de potasio de *Streptomyces*



Proteína de cápside MS2 de bacteriófago

Transferasa humana de hipoxantina-guanina fosforribosilo



Fotosistema de *Rhodopseudomonas*

Figura 4.25 ▲
Estructura cuaternaria. **a)** Isomerasa de triosa fosfato de pollo (*Gallus gallus*) [PDB 1TIM]. Esta proteína tiene dos subunidades idénticas con pliegues de barril α/β. **b)** Proteasa aspártica de VIH-1 [PDB 1DIF]. Esta proteína tiene dos subunidades idénticas todas β que se unen en forma simétrica. La proteasa VIH es el objetivo de muchos medicamentos nuevos para el tratamiento de pacientes con SIDA. **c)** Proteína del canal de potasio de *Streptomyces lividans* [PDB 1BL8]. Esta proteína unida a la membrana tiene cuatro subunidades idénticas, cada una de las cuales contribuye con un haz de ocho hélices, que se esparce por la membrana. **d)** Proteína de cápside MS2 de bacteriófago [PDB 2MS2]. La unidad básica de la cápside MS2 es un trímero de dos subunidades idénticas con una lámina β grande. **e)** Transferasa humana de hipoxantina-guanina fosforribosilo (*Homo sapiens*) (HGPRT) [PDB 1BZY]. La HGPRT es una proteína tetramérica que contiene dos tipos distintos de subunidades. **f)** Fotosistema de *Rhodopseudomonas viridis* [PDB 1PRC]. Esta proteína compleja, unida a la membrana, tiene dos subunidades idénticas (naranja, azul) y otras dos subunidades (púrpura, verde) unidas a varias moléculas de pigmentos fotosintéticos. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

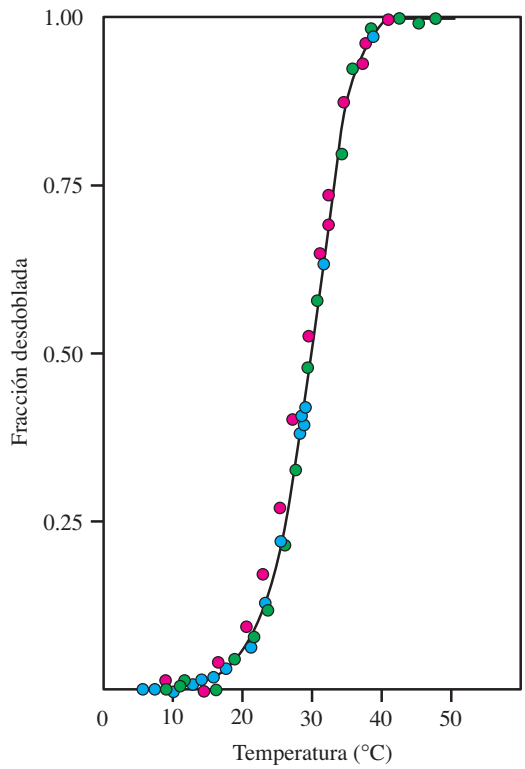
4.9 Desnaturalización y renaturalización de las proteínas

Los cambios en el ambiente o los tratamientos químicos pueden alterar la conformación nativa de una proteína con la pérdida concomitante de su actividad biológica. Esa alteración se llama **desnaturalización**. La cantidad de energía necesaria para causar la desnaturalización es pequeña, con frecuencia, quizá la equivalente a la que se necesita para alterar tres o cuatro puentes de hidrógeno. Algunas proteínas pueden desdoblarse por completo cuando están desnaturalizadas y forman una hélice aleatoria (una cadena fluctuante que se considera totalmente desordenada); no obstante, la mayor parte de las proteínas desnaturalizadas conserva una estructura interna considerable. A veces es posible encontrar condiciones bajo las cuales las proteínas desnaturalizadas pueden renaturalizarse, o volverse a plegar, en forma espontánea después de haber estado desnaturalizadas.

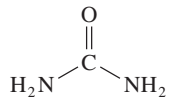
Las proteínas se suelen desnaturalizar por calentamiento. Bajo condiciones adecuadas, un aumento modesto de temperatura causa el desdoblamiento y pérdida de las estructuras secundaria y terciaria. Un ejemplo de la desnaturalización térmica se presenta en la figura 4.26. En este experimento una solución de ribonucleasa bovina A se calienta con lentitud mientras se vigila la estructura de la proteína mediante diversas técnicas enfocadas en medir los cambios de conformación. Cualquiera de esas técnicas detecta un cambio cuando hay desnaturalización. En el caso de la ribonucleasa A bovina, la desnaturalización térmica también requiere un agente reductor que altere los puentes internos de disulfuro permitiendo que se desdoble la proteína. (La estructura de la ribonucleasa A nativa se aprecia en la figura 4.3).

La desnaturalización sucede dentro de límites relativamente estrechos de temperatura. Ello indica que el desdoblado es un proceso cooperativo: la desestabilización de sólo unas pocas interacciones débiles causa una pérdida casi completa de la conformación nativa. La mayor parte de las proteínas presenta una temperatura característica de "fusión" (T_m) que corresponde a la temperatura en el punto medio de la transición entre las formas nativa y desnaturalizada. La T_m depende del pH y de la fuerza iónica de la solución.

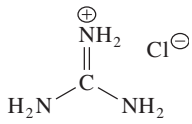
Bajo condiciones fisiológicas, la mayor parte de las proteínas son estables hasta temperaturas de 50 a 60°C. Sin embargo, hay algunas especies de bacterias, como las que habitan en las fuentes térmicas y en la cercanía de las ventilas térmicas oceánicas



◀ Figura 4.26
Calor de desnaturalización de la ribonucleasa A. Se calentó una solución de ribonucleasa A en KCl 0.02 M a pH 2.1. Se vigiló el desdoblado por cambios en absorbencia ultravioleta (azul), viscosidad (rojo) y rotación óptica (verde). [Adaptado de Ginsburg, A. y Carroll, W. R. (1965). Some specific ion effects on the conformation and thermal stability of ribonuclease. *Biochemistry* 4:2159-2174]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).



Urea



Cloruro de guanidinio

Figura 4.27 ▲
Urea y cloruro de guanidinio.

profundas que prosperan a temperaturas muy superiores a las de este intervalo. En estas especies, las proteínas tienen T_m muy alta, como es de esperarse. Los investigadores estudian estas proteínas para determinar cómo es que resisten a la desnaturalización.

Las proteínas también se pueden desnaturalizar con dos tipos de sustancias químicas: agentes caotrópicos y detergentes (sección 2.4). Altas concentraciones de agentes caotrópicos, como urea y sales de guanidinio (figura 4.27), desnaturalizan a las proteínas porque permiten que las moléculas de agua solvaten a grupos no polares en su interior. Las moléculas de agua interrumpen las interacciones hidrofóbicas que en el caso normal estabilizan la conformación nativa. Las colas hidrofóbicas de detergentes, como el dodecilsulfato de sodio (figura 2.8), también desnaturalizan las proteínas al penetrar a su interior y alterar las interacciones hidrofóbicas.

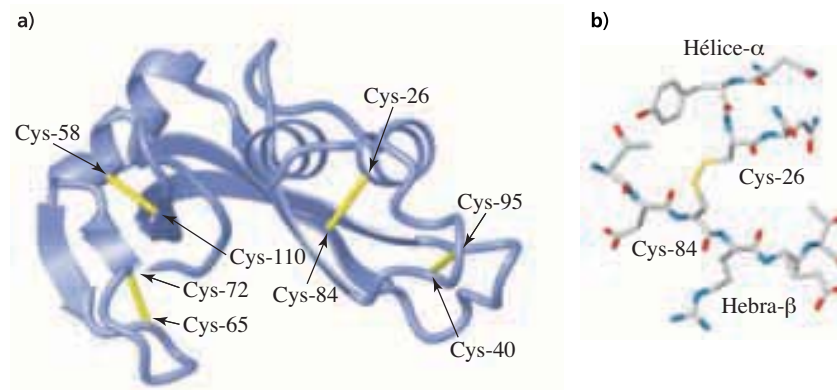
La conformación nativa de algunas proteínas (como la ribonucleasa A) se estabiliza debido a puentes disulfuro. En general, estos puentes no se encuentran en las proteínas intracelulares, pero a veces existen en proteínas que segregan las células. La presencia de puentes de disulfuro determina que las proteínas sean menos susceptibles a desdoblarse y a su posterior degradación al abandonar el ambiente intracelular. La formación de puentes disulfuro no impulsa el plegado de la proteína; más bien los enlaces se forman cuando dos residuos de cisteína se ubican en forma adecuada, una vez que la proteína se ha doblado. La formación de un puente de disulfuro requiere la oxidación de los grupos tioles de los residuos de cisteína (figura 3.4), probablemente por reacciones de intercambio de disulfuro que impliquen glutatión oxidado, un tripéptido que contiene cisteína.

La figura 4.28a muestra las ubicaciones de los puentes disulfuro en la ribonucleasa A. (Compárese esta orientación de la proteína con la que se ve en la figura 4.3). Hay cuatro puentes disulfuro; pueden unir hebras β adyacentes, hebras β con hélices α o hebras β con asas. La figura 4.28b es una vista del puente de disulfuro entre un residuo de cisteína en una hélice α (Cys-26) y un residuo de cisteína en una hebra β (Cys-84). Obsérvese que el enlace S—S no se alinea con las cadenas laterales de cisteína. Los puentes de disulfuro se forman siempre que se acercan los dos grupos sulfhidrilo de la cisteína en la conformación nativa.

La desnaturalización completa de las proteínas que contienen puentes de disulfuro requiere romper esos enlaces, además de la alteración de interacciones hidrofóbicas y de los puentes de hidrógeno. El 2-mercaptoetanol u otros reactivos tioles se pueden agregar a un medio desnaturalizante para reducir todos los puentes de disulfuro a grupos sulfhidrilo (véase la figura 3.19). La reducción de los puentes de disulfuro en una proteína se acompaña de la oxidación del tiol reactivo.

Christian B. Anfinsen y sus colaboradores estudiaron la ruta de renaturalización para la ribonucleasa A, que había sido desnaturalizada en presencia de agentes tioles reductores. Como la ribonucleasa A es una proteína relativamente pequeña (124 residuos de aminoácidos), se vuelve a doblar (se renaturaliza) con rapidez, una vez que regresa a las condiciones en que la forma nativa es estable (es decir, enfriada a menos de la temperatura de fusión, o separada de una solución de agentes caotrópicos). Anfinsen fue de los primeros en demostrar que las proteínas desnaturalizadas se pueden volver a plegar en forma espontánea llegando a su conformación nativa. Ello indica que la información necesaria para la conformación tridimensional nativa está contenida en la secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica. En otras palabras, la estructura primaria determina la estructura terciaria.

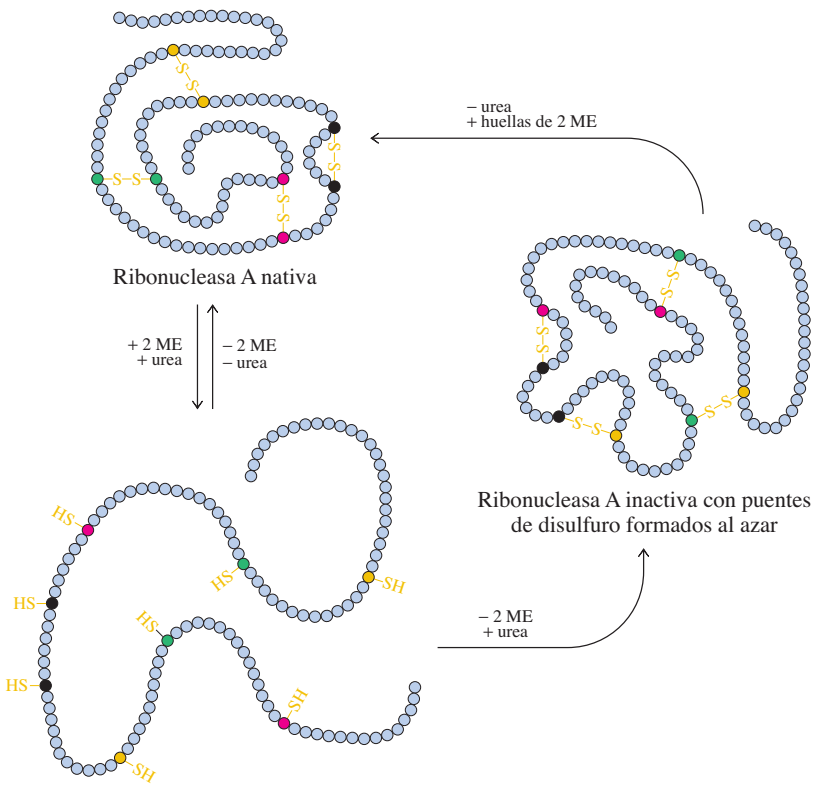
Figura 4.28 ▶
Puentes de disulfuro en ribonucleasa A bovina. **a)** Ubicación de los puentes de disulfuro en la proteína nativa. **b)** Vista del puente de disulfuro entre Cys-26 y Cys-84 [PDB 2A4S]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).



La desnaturalización de la ribonucleasa A con urea 8 M que contenga 2-mercaptoetanol da como resultado la pérdida completa de la estructura terciaria y de la actividad enzimática, y produce una cadena polipeptídica que contiene ocho grupos sulfhidrilo (figura 4.29). Cuando se elimina el 2-mercaptoetanol y se permite la oxidación en presencia de urea, los grupos sulfhidrilo se aparean en forma aleatoria, por lo que aproximadamente 1% de la población de proteína forma los cuatro puentes de disulfuro correctos y recupera su actividad enzimática original. (Si los ocho grupos sulfhidrilo se aparean en forma aleatoria, es posible formar 105 estructuras unidas por disulfuro —7 apareamientos posibles para el primer enlace, 5 para el segundo, 3 para el tercero y 1 para el cuarto: $7 \times 5 \times 3 \times 1 = 105$—, pero sólo una de estas estructuras es la correcta). Pese a ello, cuando urea y 2-mercaptoetanol se eliminan al mismo tiempo y a continuación se exponen al aire soluciones diluidas de la proteína reducida, la ribonucleasa A adquiere su conformación nativa en forma espontánea, su conjunto correcto de puentes de disulfuro y su actividad enzimática total. Las proteínas inactivas que contienen puentes de disulfuro formados aleatoriamente se pueden renaturalizar si se elimina la urea, se agrega una cantidad pequeña de 2-mercaptoetanol y la solución se calienta con suavidad. Los experimentos de Anfinsen demuestran que los puentes de disulfuro correctos sólo pueden formarse después que la proteína se dobla en su conformación nativa. Anfinsen llegó a la conclusión de que la renaturalización de la ribonucleasa A es espontánea y que está totalmente activada por la energía libre ganada al cambiar a la conformación fisiológica estable. Esta conformación está determinada por la estructura primaria.

Cuando las proteínas se doblan en el interior de una célula, a veces adoptan una conformación que no es la nativa y forman puentes de disulfuro incorrectos. Anfinsen descubrió una enzima, la isomerasa de disulfuro de proteína (PDI), que cataliza la reducción de esos enlaces incorrectos. Todas las células vivas desarrollan tal actividad. En la figura 4.23o se aprecia la estructura de la forma reducida de la isomerasa de disulfuro (DsbA) de *E. coli*. La enzima contiene dos residuos de cisteína reducida colocados en el

▲ Christian B. Anfinsen (1916-1995): se le otorgó el Premio Nobel de Química en 1972 por sus trabajos sobre replegamiento de proteínas.



◀ **Figura 4.29**
Desnaturalización y renaturalización de ribonucleasa A. El tratamiento de la ribonucleasa A (arriba) con urea en presencia de 2-mercaptoetanol desdobla la proteína y rompe los puentes de disulfuro para producir ribonucleasa A reducida y desnaturalizada reversiblemente (abajo). Cuando la proteína desnaturalizada se regresa a las condiciones fisiológicas en ausencia de 2-mercaptoetanol, se vuelve a plegar y adquiere su conformación nativa y se forman los puentes de disulfuro correctos. Sin embargo, cuando sólo se elimina el 2-mercaptoetanol, la ribonucleasa A se vuelve a oxidar en presencia de aire, pero los puentes de disulfuro se forman al azar y producen una proteína inactiva (como la que se ve a la derecha). Cuando la urea se elimina, se agregan huellas de 2-mercaptoetanol a la proteína oxidada al azar y la solución se calienta suavemente, los puentes de disulfuro se rompen y se vuelven a formar correctamente, produciendo la ribonucleasa A nativa. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

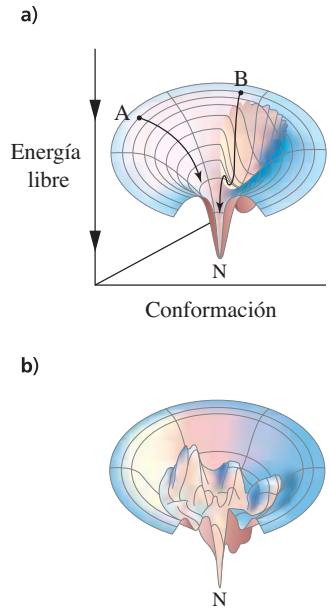


Figura 4.30 ▲
Pozo de energía para el plegado de proteína. Los embudos representan el potencial de energía libre de plegamiento de proteínas. **a)** Embudo simplificado mostrando dos rutas posibles hacia la proteína nativa, de baja energía. En la ruta B, el polipéptido entra a un mínimo local de baja energía a medida que se pliega. **b)** Versión más realista de las formas posibles de energía libre para el plegamiento de una proteína, con muchos picos y valles locales.

sitio activo. Cuando la proteína mal plegada se enlaza, la enzima cataliza una reacción de intercambio de disulfuro, donde se reduce el disulfuro en la proteína mal plegada y se forma un nuevo puente de disulfuro entre los dos residuos de cisteína en la enzima. Entonces la proteína mal doblada se suelta y se puede volver a plegar hasta alcanzar la conformación nativa de alta energía.

4.10 Plegado de proteínas y estabilidad

En la célula se sintetizan nuevos polipéptidos por un complejo de traducción que incluye ribosomas, ARNm y varios factores más (capítulo 21). A medida que el polipéptido recién sintetizado emerge del ribosoma, se pliega en su forma tridimensional característica. Las proteínas dobladas ocupan un pozo de baja energía que hace que la estructura nativa sea mucho más estable que las conformaciones alternativas (figura 4.30). Los experimentos de Anfinsen *in vitro* y de muchos otros bioquímicos demuestran que muchas proteínas se pueden plegar en forma espontánea y llegar a esta conformación de baja energía.

Se cree que a medida que una proteína se pliega, el primer par de interacciones inicia otras interacciones que contribuyen al alineamiento de grupos. Este proceso se llama cooperatividad de plegamiento y representa el fenómeno por el que la formación de una parte de una estructura causa la formación de las partes restantes. Conforme la proteína inicia su plegamiento adopta energías cada vez menores y comienza a caer en el pozo de energía de la figura 4.30. La proteína puede quedar atrapada momentáneamente en un pozo de energía local (que se indica como pequeñas bajadas en el diagrama de energía), pero al final llega al mínimo de energía en el fondo del pozo. En su conformación estable final, la proteína nativa es mucho menos sensible a la degradación que una cadena de polipéptido extendida y desdoblada. Así, las proteínas nativas pueden tener vidas medias de muchas generaciones celulares y algunas moléculas pueden perdurar décadas.

El doblamiento es rápido en extremo; en la mayor parte de los casos se llega a la conformación nativa en menos de un segundo. El plegado y la estabilización de las proteínas dependen de varias fuerzas no covalentes, como el efecto hidrofóbico, los puentes de hidrógeno, las interacciones de van der Waals y las interacciones entre cargas. Aunque las interacciones no covalentes son débiles en lo individual, en lo colectivo determinan la estabilidad de las conformaciones nativas de las proteínas. La debilidad de cada interacción no covalente suministra la elasticidad y flexibilidad necesarias para que las proteínas sufran cambios pequeños de conformación. (Los puentes de disulfuro covalentes también contribuyen a la estabilidad de ciertas proteínas).

No se ha descrito todavía una ruta real de plegado de proteína en detalle, pero las investigaciones actuales se enfocan en intermediarios de las rutas de doblado de varias proteínas. En la figura 4.31 se ven varias rutas de plegado hipotéticas. Durante el plegado de la proteína, el polipéptido se aplasta sobre sí mismo debido al efecto hidrofóbico y se comienzan a formar elementos de la estructura secundaria. Este eslabón intermedio se llama glóbulo fundido. Los pasos posteriores son el reordenamiento de la cadena de columna vertebral para formar los motivos característicos y, por último, la conformación nativa estable. Cada dominio en una proteína de multidominio forma dobleces en forma independiente.

El mecanismo de plegado de proteínas es uno de los problemas más desafiantes de la bioquímica. Es espontáneo y debe estar determinado en gran parte por la estructura primaria (la secuencia) del polipéptido. En consecuencia, debe ser posible indicar la estructura de una proteína conociendo su secuencia de aminoácidos. En años recientes se avanzó mucho al modelar el plegado mediante computadoras rápidas. En el resto de esta sección se examinan las fuerzas que estabilizan la estructura de las proteínas y el papel de los chaperones en el plegamiento de las proteínas.

A. El efecto hidrofóbico

Las proteínas son más estables en agua cuando sus cadenas laterales hidrofóbicas se agrupan en el interior de la proteína y no quedan expuestas al medio acuoso en la superficie. Como las moléculas de agua interaccionan con más fuerza entre sí que con las ca-

◀ Figura 4.31
Rutas hipotéticas de plegamiento de proteína. Las cadenas de polipéptido, extendidas al principio, forman estructuras secundarias parciales, después estructuras terciarias aproximadas, y por último las conformaciones nativas únicas. Las flechas dentro de las estructuras indican la dirección del N-terminal al C.

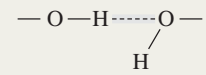
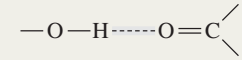
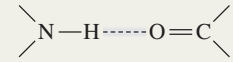
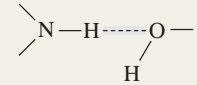
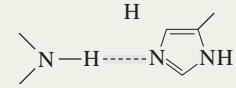
denas laterales no polares de una proteína, estas cadenas son impulsadas a vincularse entre sí, lo cual determina que la cadena polipeptídica se colapse y forme un glóbulo fundido más compacto. Durante el plegado, la disminución de entropía del polipéptido más que se contrarresta por el aumento de la entropía del solvente, cuando se liberan moléculas de agua que estaban unidas a la proteína. (El plegado también altera las jaulas extendidas de moléculas de agua que rodean a los grupos hidrofóbicos). Este aumento general de entropía constituye la principal fuerza impulsora del plegado. Mientras que las cadenas laterales no polares son impulsadas hacia el interior de la proteína, la mayor parte de las cadenas laterales polares quedan en contacto con el agua, en la superficie de la proteína. Los tramos de la columna vertebral polar que son impulsados al interior de una proteína neutralizan su polaridad con puentes de hidrógeno mutuos y con frecuencia generan estructuras secundarias. Así, la naturaleza hidrofóbica del interior no sólo explica la asociación de residuos hidrofóbicos sino que también contribuye a la estabilidad de hélices y láminas. Los estudios de las rutas de doblado indican que el colapso hidrofóbico y la formación de estructuras secundarias son simultáneos.

Hay ejemplos localizados de este efecto hidrofóbico como las interacciones del lado hidrofóbico de una hélice α anfipática con el interior de la proteína (sección 4.4) y la región hidrofóbica entre las láminas β en la estructura de emparedado β (sección 4.5). La mayor parte de los ejemplos que se ven en las figuras 4.24 y 4.25 contiene regiones yuxtapuestas de estructura secundaria que se hallan estabilizadas por interacciones hidrofóbicas entre las cadenas laterales de residuos de aminoácido hidrofóbicos.

B. Puentes de hidrógeno

Los puentes de hidrógeno contribuyen a la cooperatividad del plegamiento y ayudan a estabilizar las conformaciones nativas de las proteínas. Los primeros puentes de hidrógeno son los que se forman en las hélices α, las láminas β y los giros, y forman regiones definidas de la estructura secundaria. La estructura nativa final contiene también puentes de hidrógeno entre la columna vertebral del polipéptido y el agua, entre aquélla y las cadenas laterales polares, entre dos cadenas laterales polares y entre éstas y el agua. La tabla 4.1 muestra algunos de los diversos tipos de puentes de hidrógeno que caracterizan a las proteínas junto con sus longitudes típicas de enlace. La mayor parte de los puentes de hidrógeno en las proteínas es del tipo N—H—O. La distancia entre los átomos donador y aceptador varía de 0.26 a 0.34 nm y los puentes pueden desviarse de la linealidad hasta en 40°. Recuérdese que los puentes de hidrógeno dentro del interior hidrofóbico de una proteína son mucho más estables que los que se forman cerca

TABLA 4.1 Ejemplos de puentes de hidrógeno en proteínas

Tipo de puente de hidrógeno		Distancia típica entre átomo donador y aceptador (nm)
Hidroxilo-hidroxilo		0.28
Hidroxilo-carbonilo		0.28
Amida-carbonilo		0.29
Amida-hidroxilo		0.30
Amida-nitrógeno de imidazol		0.31

de la superficie porque los puentes de hidrógeno internos no compiten con las moléculas de agua.

C. Interacciones de van der Waals e interacciones entre cargas

Los contactos de van der Waals entre cadenas laterales no polares también contribuyen a la estabilidad de las proteínas. Es difícil determinar el grado de estabilización debido a interacciones optimizadas de van der Waals. Es probable que el efecto acumulado de varias interacciones de van der Waals represente una contribución apreciable a la estabilidad porque las cadenas laterales no polares en el interior de una proteína están empacadas en forma densa.

Es posible que las interacciones entre cargas (o interacciones carga-carga), de cadenas laterales con carga opuesta signifique una contribución pequeña a la estabilidad de las proteínas. La mayor parte de las cadenas laterales iónicas se localiza en las superficies, donde están solvatadas y sólo pueden contribuir en forma mínima a la estabilización general de la proteína; no obstante, en ocasiones dos iones con carga opuesta forman un par de iones en el interior de una proteína. Esos pares de iones (o pares iónicos) son mucho más fuertes que los que están expuestos al agua.

D. Los chaperones moleculares colaboran en el plegamiento de las proteínas

Los estudios sobre plegado de proteínas han conducido a dos observaciones generales acerca del doblamiento de cadenas de polipéptido para dar lugar a proteínas con actividad biológica. La primera consiste en que el doblamiento de proteínas no implica una búsqueda aleatoria en el espacio tridimensional para llegar a la conformación nativa. En lugar de ello, parece que el plegado de proteínas es un proceso cooperativo y secuencial donde la formación de los primeros elementos estructurales ayuda al alineamiento de las características estructurales siguientes. [La necesidad de cooperatividad queda ilustrada por un cálculo de Cyrus Levinthal. Imagínese un polipéptido de 100 residuos. Si cada residuo tuviera tres conformaciones posibles, una búsqueda aleatoria entre todas las conformaciones para llegar al polipéptido completo ¡duraría 10^{87} segundos! —muchas veces la edad estimada del Universo, que es de 6×10^{17} segundos—].

La segunda es que la pauta de doblado y la conformación final de una proteína dependen de su estructura primaria. Como se explicó en el caso de la ribonucleasa A, las proteínas simples se pueden doblar en forma espontánea y adquirir sus conformaciones nativas en un tubo de ensayo sin absorber energía ni recibir ayuda. Las proteínas mayores

también se doblan en forma espontánea y forman una estructura nativa ya que la conformación final representa la forma con energía libre mínima. Sin embargo, es probable que las proteínas mayores permanezcan atrapadas en forma temporal en un pozo de energía local como el que ilustra la figura 4.30b. La presencia de estas conformaciones metaestables e incorrectas, en el mejor de los casos, retarda la velocidad de plegamiento de la proteína y en el peor determina que se agreguen intermediarios de plegado y salgan de la solución. La tasa de doblamiento correcto de una proteína aumenta debido a un grupo de proteínas especiales ubicuas llamadas chaperones moleculares.

Los chaperones aumentan la velocidad de plegamiento correcto de algunas proteínas al unir polipéptidos recién sintetizados antes que se doblen por completo. Evitan la formación de intermediarios mal doblados que puedan atrapar al polipéptido en una forma aberrante. También los chaperones pueden unirse a subunidades de proteína sin ensamblar para evitar que se agreguen en forma incorrecta y se precipiten antes de ser ensambladas para formar una proteína completa de múltiples subunidades.

Hay muchos chaperones diferentes. En su mayor parte son proteínas de choque por calor —proteínas que se sintetizan como respuesta a aumentos de temperatura (choque térmico) u otros cambios que causen desnaturalización de la proteína *in vivo.* El papel de las proteínas de choque por calor, que hoy se denominan chaperones, es reparar el daño causado por aumentos de temperatura al unirse a proteínas desnaturalizadas y ayudarles a volver a doblarse con rapidez y llegar a su conformación nativa.

La principal proteína de choque por calor es la HSP70 (de *heat shock protein,* M_r = 70 000). Esta proteína existe en todas las especies, excepto en algunas de arqueobacterias. En las bacterias también se llama DnaK. El papel normal de la chaperona HSP70 es unirse a proteínas nacientes mientras se están sintetizando para evitar el agrupamiento o el atrapamiento en un pozo local de baja energía. La unión y liberación de los polipéptidos nacientes se acopla con la hidrólisis de ATP y en general requiere proteínas accesorias adicionales. Las HSP70/DnaK son unas de las proteínas más conservadas que se conocen en toda la biología. Ello indica que el plegamiento de proteína asistido por chaperón es un requisito ancestral y esencial para la síntesis eficiente de proteínas con la estructura tridimensional correcta.

Otra chaperona importante y ubicua se llama chaperonina (en las bacterias también se llama GroE). También la chaperonina es una proteína de choque por calor (Hsp60) que juega un papel importante y esencial ayudando al plegamiento normal de las proteínas en el interior de la célula.

La chaperonina de *E. coli* es una proteína compleja de multisubunidades. La estructura interior consiste en dos anillos que contienen siete subunidades GroEL idénticas. Cada subunidad puede unirse a una molécula de ATP (figura 4.32a, página 114). En la figura 4.33 de la página siguiente se muestra una versión simplificada del plegamiento asistido por chaperonina. Las proteínas desdobladas se unen a la cavidad central hidrofóbica encerrada por los anillos. Cuando el plegamiento concluye, la proteína es liberada por hidrólisis de las moléculas enlazadas de ATP. La ruta real es más complicada y requiere un componente adicional que sirve como tapa o tapón, sellando un extremo de la cavidad central mientras se efectúa el proceso de plegado. La tapa contiene siete subunidades de GroES que forman un anillo adicional (figura 4.32c). La conformación del anillo GroEL se puede alterar durante el plegado para aumentar el tamaño de la cavidad, y el papel de la tapa es evitar que la proteína desdoblada se libere en forma prematura.

Como se dijo antes, algunas proteínas tienden a agruparse durante el plegamiento en ausencia de chaperones. Es probable que el agrupamiento se deba a la formación temporal de superficies hidrofóbicas en los intermediarios de plegado. Los intermediarios se unen entre sí y el resultado es que son excluidos de la solución y ya no pueden explorar las conformaciones representadas por el embudo de energía de la figura 4.30. Las chaperoninas aíslan las cadenas de polipéptido en la cavidad de doblamiento, con lo cual evitan que los intermediarios de plegamiento se agrupen. La cavidad de plegamiento sirve como "jaula de Anfinsen" que permite que la cadena llegue a la conformación correcta, de baja energía, sin interferencia por otros intermediarios de doblamiento.

La cavidad central de la chaperonina es suficientemente grande para abarcar una cadena de polipéptido de unos 630 residuos de aminoácidos (M_r ~ 70 000). Así, el plegado de la mayor parte de las proteínas de tamaño pequeño y mediano puede ser asistido por chaperoninas. Sin embargo, sólo de 5 a 10% de las proteínas de *E. coli* (es decir, unas 300 proteínas diferentes) parece interactuar con la chaperonina durante la síntesis

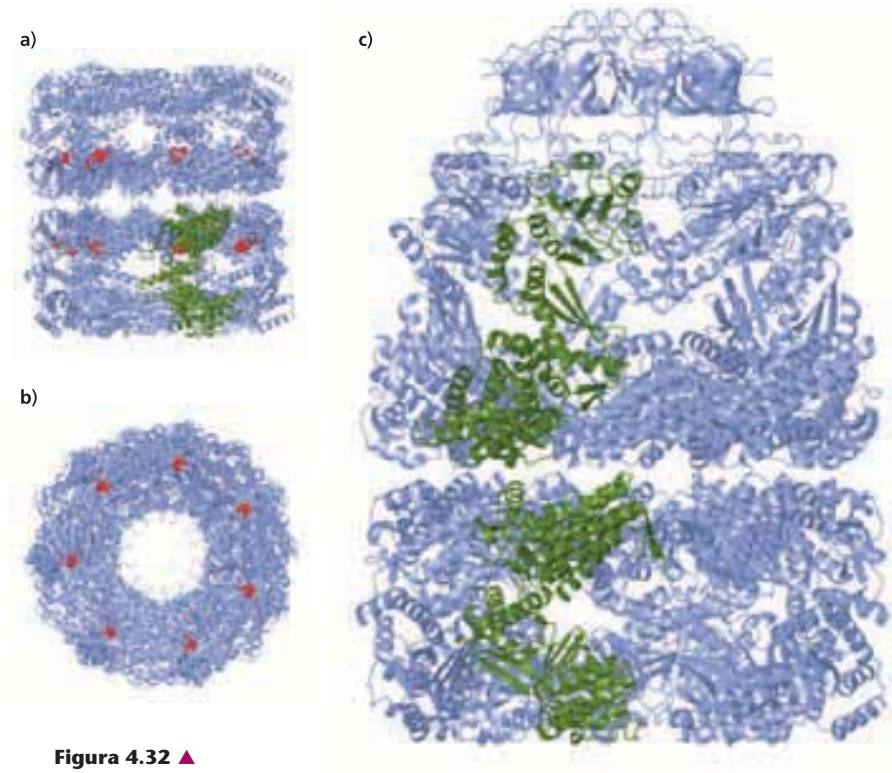
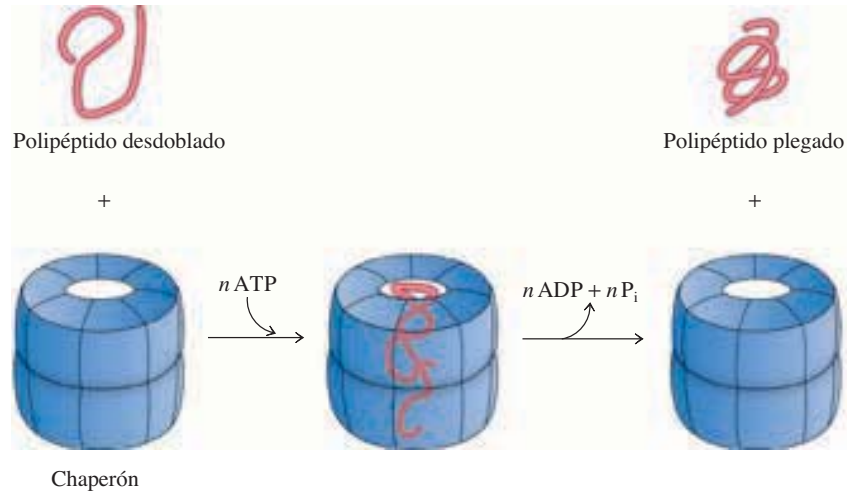


Figura 4.32 ▲
Chaperonina de *Escherichia coli* (GroE). La estructura nuclear consiste en dos anillos idénticos formados por siete subunidades de GroEL. Las proteínas desdobladas se unen a la cavidad central. Se pueden identificar las moléculas de ATP enlazadas por sus átomos de oxígeno rojos. **a)** Vista lateral. **b)** Vista superior mostrando la cavidad central. [PDB 1DER]. **c)** Durante el plegamiento aumenta el tamaño de la cavidad central de los anillos y el extremo se obtura con una proteína que contiene siete subunidades de GroES. [PDB 1AON]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

de proteínas. Es más probable que las proteínas de tamaño mediano y las de la clase estructural α/β requieran doblamiento asistido por chaperonina. Las proteínas más pequeñas pueden doblarse con rapidez por sí mismas. Varias de las proteínas restantes en la célula podrán necesitar otros chaperones, como la HSP70/DnaK.

Los chaperones parecen inhibir rutas incorrectas de plegamiento y ensamble al formar complejos estables con las superficies de las cadenas de polipéptidos que sólo están expuestas durante la síntesis, plegado y ensamblado. Aun en presencia de chaperones,

Figura 4.33 ▶
Plegamiento de proteína asistido por chaperonina. El polipéptido desdoblado entra en la cavidad central de la chaperonina, donde se dobla. Se requiere la hidrólisis de varias moléculas de ATP para que la chaperonina funcione.



el doblamiento de las proteínas es espontáneo; por esta razón el plegamiento de proteínas asistido por chaperones se ha descrito como autoensamble asistido.

4.11 La colágena, una proteína fibrosa

Para terminar el examen de la estructura tridimensional de las proteínas se examinarán varias de ellas para comprender cómo se relacionan sus estructuras con sus funciones biológicas. Las proteínas seleccionadas para estudiar con más detalle son la colágena, una proteína estructural, la mioglobina y la hemoglobina, proteínas que unen oxígeno (secciones 4.12 y 4.13) y los anticuerpos (sección 4.14).

La colágena es la principal proteína componente del tejido conectivo de los vertebrados; constituye de 25 a 35% de las proteínas totales en los mamíferos. Las moléculas de colágena tienen formas y funciones notablemente distintas. Por ejemplo, en los tendones forman fibras rígidas, encordadas, de una notable resistencia a la tensión; en la piel, la colágena adquiere la forma de fibras tejidas de forma holgada que permiten la expansión en todas direcciones.

La estructura de la colágena fue estudiada por G. N. Ramachandran (famoso por sus diagramas de Ramachandran, sección 4.3). La molécula consiste en tres cadenas helicoidales izquierdas enrolladas entre sí para formar una superhélice derecha. Cada hélice izquierda en la colágena presenta 3.0 residuos de aminoácidos por vuelta, y su paso es de 0.94 nm, que implica un ascenso de 0.31 nm por molécula. En consecuencia, una hélice de colágena es más extendida que una hélice α, y la estructura helicoidal de la colágena no es igual que el motivo de espiral enrollada descrito en la sección 4.7. (Varias proteínas sin relación con la colágena forman también superhélices similares de tres cadenas).

La triple hélice de la colágena se encuentra estabilizada por puentes de hidrógeno intercatenarios. La secuencia de la proteína en la región helicoidal consiste en repeticiones múltiples de la forma –Gly–X–Y–, donde con frecuencia X es prolina y Y es una prolina modificada llamada 4-hidroxiprolina (figura 4.34). Los residuos de glicina están ubicados a lo largo del eje central de la triple hélice, donde el empacamiento apretado de las hebras de proteína ya no puede dar cabida a otro residuo. Por cada triplete de –Gly–X–Y– se forma un puente de hidrógeno entre el átomo de hidrógeno de amida en la glicina en una cadena y el átomo de oxígeno carbonílico del residuo X en una cadena adyacente (figura 4.35). Los puentes de hidrógeno que forma el grupo hidroxilo de la hidroxiprolina también pueden estabilizar a la triple hélice de la colágena. A diferencia de la hélice α más común, la hélice de la colágena carece de puentes de hidrógeno intracatenarios (figura 4.36).

Además de la hidroxiprolina, la colágena contiene un residuo adicional de aminoácido modificado llamado 5-hidroxilisina (figura 4.37, página 116). Algunos residuos de hidroxilisina están unidos en forma covalente con residuos de carbohidrato haciendo de la colágena una glicoproteína. No se conoce el papel de esta glicosilación.

Los residuos de hidroxiprolina y de hidroxilisina se forman cuando se hidroxilan residuos específicos de prolina y lisina, después de incorporarse en las cadenas de polipéptido de la colágena. Las reacciones de hidroxilación son catalizadas por enzimas y requieren ácido ascórbico (vitamina C). La hidroxilación se altera en ausencia de vitamina C y la triple hélice de la colágena no se ensambla bien. Las personas con carencia de vitamina C padecen escorbuto, enfermedad cuyos síntomas incluyen lesiones cutáneas, vasos sanguíneos frágiles, dientes flojos y encías sangrantes. Los humanos son mamíferos excepcionales porque perdieron la capacidad de sintetizar vitamina C. En los humanos, uno de los genes necesarios para la síntesis de la vitamina C está mutado, lo que los hace dependientes de las frutas y otras fuentes exógenas de esta vitamina clave.

La flexibilidad conformacional limitada de los residuos de prolina e hidroxiprolina evita la formación de hélices α en las cadenas de colágena y también determina que la colágena resulte más rígida. (Recuérdese que casi nunca se encuentra prolina en las hélices α). La presencia de residuos de glicina en cada tercera posición permite que las cadenas de colágena formen una hélice izquierda, enrollada en forma apretada, donde tienen cabida los residuos de prolina. (Recuérdese que la flexibilidad de los residuos de glicina tiende a alterar la hélice α derecha).

Las triples hélices de la colágena se agrupan en una forma escalonada y forman fibras fuertes e insolubles. La resistencia y rigidez de las fibras de colágena se deben en

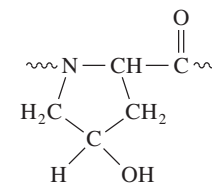


Figura 4.34 ▲
Residuo de 4-hidroxiprolina. Estos residuos se forman por hidroxilación de residuos de prolina catalizada por enzimas.

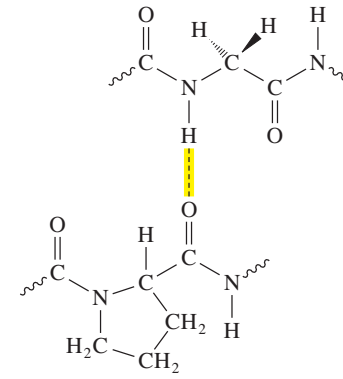


Figura 4.35 ▲
Puentes de hidrógeno entre cadenas en la colágena. El hidrógeno de amida en un residuo de glicina, de una cadena, forma puente con el oxígeno carbonílico de un residuo (que con frecuencia es de prolina) en una cadena adyacente.

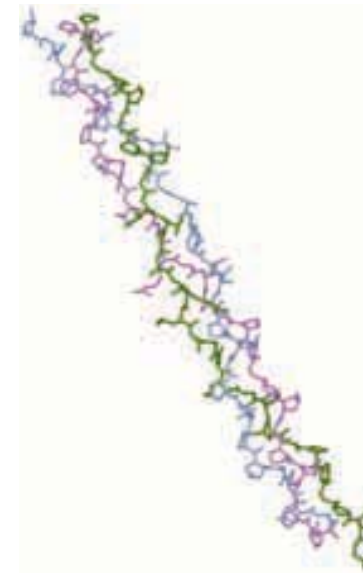


Figura 4.36 ▲
Triple hélice de colágena humana tipo III. La región extendida de colágena contiene tres subunidades idénticas (púrpura, azul claro y verde). Se enrollan entre sí tres hélices izquierdas de colágena y forman una superhélice derecha. [PDB 1BKV]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

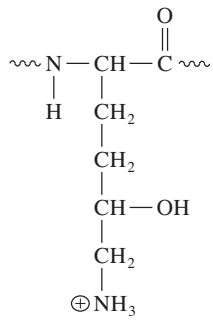


Figura 4.37 ▲
Residuo de 5-hidroxilisina. Estos residuos se forman por hidroxilación de residuos de lisina catalizada por enzimas.

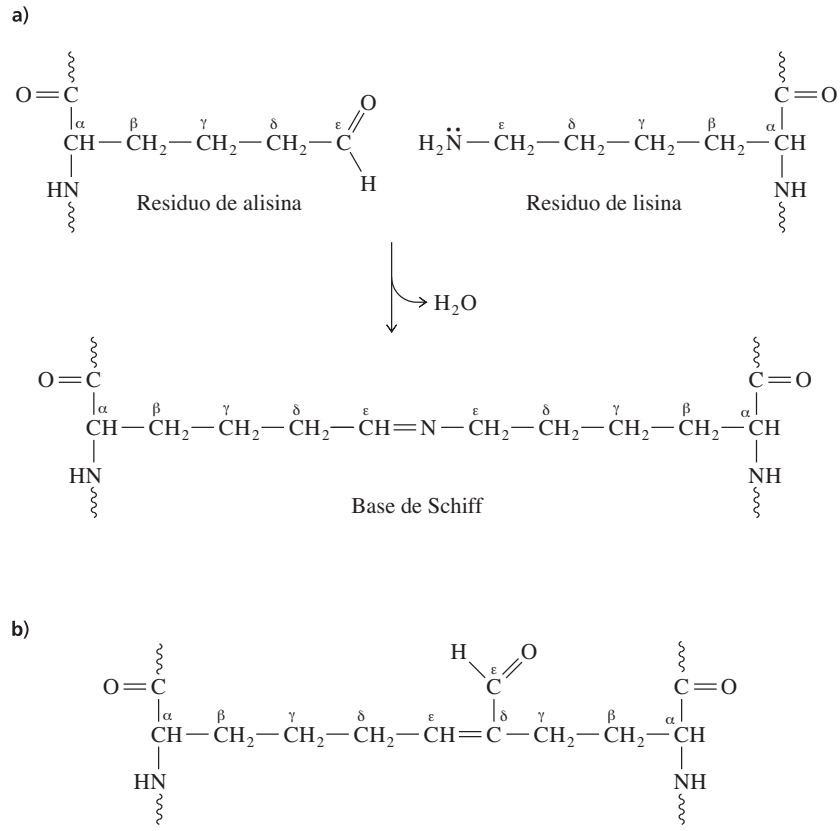


Figura 4.38 ▲
Enlaces cruzados covalentes en el colágeno. **a)** Un residuo de alisina se condensa con uno de lisina para formar un enlace cruzado de base de schiff intermolecular. **b)** Dos residuos de alisina se condensan para formar un enlace cruzado intramolecular.

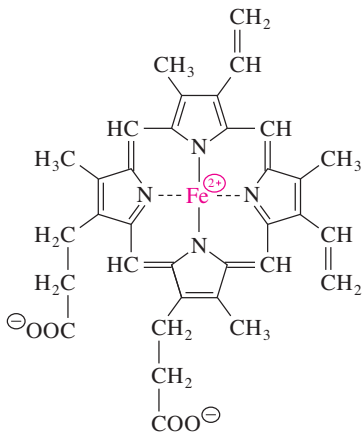


Figura 4.39 ▲
Estructura química del grupo hemo Fe(II)-protoporfirina en la mioglobina y la hemoglobina. El anillo de porfirina aporta cuatro de los seis ligandos que rodean al átomo de hierro. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

parte a enlaces cruzados covalentes. Los grupos $—CH_2NH_3^{\oplus}$ de las cadenas laterales de algunos residuos de lisina e hidroxilisina se convierten enzimáticamente en grupos aldehídos (—CHO) y producen residuos de alisina e hidroxialisina. Los residuos de alisina (y sus derivados hidroxi) reaccionan con las cadenas laterales de los residuos de lisina e hidroxilisina para formar **bases de Schiff**, que son complejos entre grupos carbonilo y aminas (figura 4.38a). Estas bases de Schiff se suelen formar entre moléculas de colágena. Los residuos de alisina reaccionan también con otros residuos de alisina por condensación aldólica para formar enlaces cruzados que se establecen en general entre las hebras individuales de la hélice triple (figura 4.38b). Los dos tipos de enlaces cruzados se convierten en enlaces más estables durante la maduración de los tejidos, pero se desconoce la química de tales conversiones.

4.12 Estructuras de la mioglobina y la hemoglobina

Como la mayor parte de las proteínas, la mioglobina (Mb) y la hemoglobina (Hb), una proteína relacionada, desempeñan sus funciones biológicas al unirse en forma selectiva y reversible a otras moléculas —en este caso, al oxígeno molecular (O_2). La mioglobina es una proteína monomérica relativamente pequeña que facilita la difusión del oxígeno en los vertebrados. Es la responsable de suministrar oxígeno a los tejidos musculares en los reptiles, aves y mamíferos. La hemoglobina es una proteína tetramérica mayor que transporta el oxígeno en la sangre.

El color rojo asociado con las formas oxigenadas de mioglobina y hemoglobina (es decir, el color rojo de la sangre oxigenada) se debe a un grupo prostético hemo (figura 4.39). (Un grupo prostético es una molécula orgánica unida a una proteína que resulta

esencial para la actividad de ésta). Un hemo consiste en un sistema anular de tetrapirrol llamado protoporfirina IX acomplejado con hierro. Los cuatro anillos pirrólicos de este sistema están unidos por puentes de meteno (—CH═), por lo que la porfirina insaturada es muy conjugada y plana. El hierro unido está en el estado de oxidación ferroso, o Fe(II); forma un complejo con seis ligandos, cuatro de los cuales son los átomos de nitrógeno de la protoporfirina IX. (Hay otras proteínas, como el citocromo *a* y el citocromo *c*, que contienen distintos grupos porfirina/hemo).

El componente polipeptídico en la mioglobina es miembro de una familia de proteínas llamadas globinas. La estructura terciaria de la mioglobina del esperma de ballena muestra que la proteína consiste en un haz de ocho hélices α (figura 4.40). Es un miembro de la categoría estructural toda α, o α total. El pliegue de globina tiene varios grupos de hélices α que forman una estructura estratificada. Las hélices adyacentes en cada capa están inclinadas y forman un ángulo que permite que las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos se interdigiten.

El interior de la mioglobina está formado en forma casi exclusiva por residuos hidrofóbicos de aminoácidos, en especial los que son muy hidrofóbicos como valina, leucina, isoleucina, fenilalanina y metionina. La superficie de la proteína contiene residuos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos. Como en el caso de la mayor parte de las proteínas, la estructura terciaria de la mioglobina se halla estabilizada por interacciones hidrofóbicas con el interior. El plegado de la cadena de polipéptido está impulsado por la minimización de energía causada por la formación de este interior hidrofóbico.

El grupo prostético hemo de la mioglobina ocupa una hendidura hidrofóbica que forman tres hélices α y dos asas. La unión de la mitad de la porfirina con el polipéptido se debe a varias interacciones débiles, incluidos las interacciones hidrofóbicas, los contactos de van der Waals y los puentes de hidrógeno. No existen enlaces covalentes entre la porfirina y las cadenas laterales de aminoácidos en la mioglobina. El átomo de hierro del hemo es el sitio de unión de oxígeno, como se muestra en la figura 4.40. Dos residuos de histidina interaccionan con el átomo de hierro y el oxígeno enlazado. La accesibilidad del grupo hemo al oxígeno molecular depende de un movimiento pequeño de las cadenas laterales de aminoácidos cercanos. Después se explicará que las hendiduras hidrofóbicas de la mioglobina y la hemoglobina son esenciales para la unión reversible con el oxígeno.

En los vertebrados el O_2 se une a moléculas de hemoglobina para su transporte en los glóbulos rojos o eritrocitos. Visto al microscopio, un eritrocito humano maduro es un disco bicóncavo que carece de núcleo o de otros compartimientos internos encerrados en una membrana (figura 4.41). Un eritrocito humano típico está lleno con unas 3×10^8 moléculas de hemoglobina.

La hemoglobina es más compleja que la mioglobina porque se trata de una proteína con varias subunidades. En los mamíferos adultos contiene dos subunidades distintas de globina llamadas α-globina y β-globina. La hemoglobina es un tetrámero $\alpha_2\beta_2$, lo que indica que contiene dos cadenas de α-globina y dos cadenas de β-globina. Cada una de esas subunidades de globina tiene estructura y secuencia parecidas a las de mioglobina, lo que refleja su evolución a partir de un gen ancestral de globina en los cordados primitivos.

Cada una de las cuatro cadenas de globina contiene un grupo prostético hemo idéntico al que posee la mioglobina. Las cadenas α y β están frente a frente a través de una cavidad central (figura 4.42). La estructura terciaria de cada una de las cuatro cade-

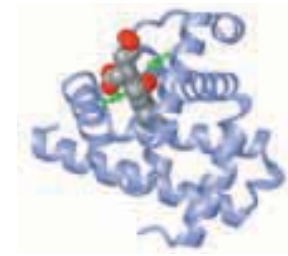


Figura 4.40 ▲
Oximioglobina de esperma de ballena (*Physeter catodon*). La mioglobina consiste en ocho hélices α. El grupo prostético hemo se une con oxígeno (rojo). La His-64 (verde) forma un puente de hidrógeno con el oxígeno, y la His-93 (verde) se acompleja con el átomo de hierro del hemo. [PDB 1A6M]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

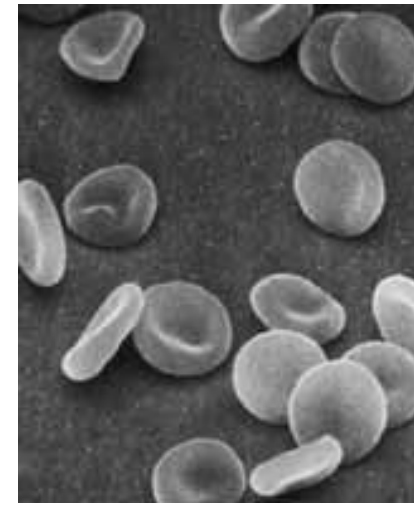
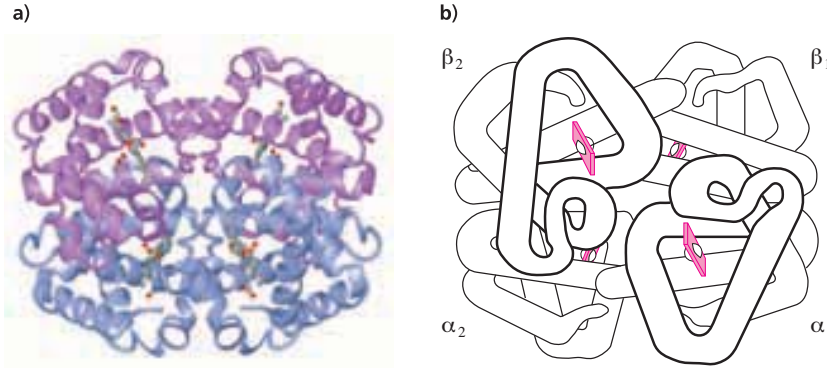


Figura 4.41 ▲
Micrografía electrónica de barrido de eritrocitos de mamífero. Cada célula contiene unos 300 millones de moléculas de hemoglobina.



◀ Figura 4.42
Oxihemoglobina humana (*Homo sapiens*). **a)** Estructura de la oxihemoglobina humana donde se ven dos unidades α y dos β. Los grupos hemo se muestran como modelos de palillos. [PDB 1HND]. **b)** Esquema del tetrámero de hemoglobina. Los grupos hemo están en rojo. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

Figura 4.43 ▲
Estructura terciaria de la mioglobina, α-globina y β-globina. Las orientaciones de las subunidades individuales de α-globina y β-globina se han desplazado para exponer las semejanzas en la estructura terciaria. Se han eliminado los grupos hemo y se han sobrepuesto las tres estructuras. Todas las estructuras son de las formas oxigenadas en las figuras 4.40 y 4.42. Clave de colores: α-globina: azul, β-globina: púrpura y mioglobina: verde. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

nas es casi idéntica a la de la mioglobina (figura 4.43). La cadena α tiene siete hélices α y la cadena β tiene ocho. (Dos hélices α cortas en la β-globina y en la mioglobina están fundidas y forman una mayor en la α-globina). Sin embargo, la hemoglobina no sólo es un tetrámero de moléculas de mioglobina. Cada cadena α interactúa en forma extensa con una cadena β, por lo que en realidad la hemoglobina es un dímero de subunidades $\alpha\beta$. En la siguiente sección se estudiará que la presencia de varias subunidades sustenta las propiedades de unión con el oxígeno, que no son posibles en la mioglobina, de cadena sencilla.

4.13 Enlazamiento del oxígeno con la mioglobina y la hemoglobina

Las actividades de enlazamiento de la mioglobina y la hemoglobina con oxígeno son un ejemplo excelente de la forma en que la estructura de la proteína se relaciona con su función fisiológica. Esas proteínas son de las más estudiadas en bioquímica. Fueron las primeras proteínas complejas cuya estructura se determinó por cristalografía de rayos X (sección 4.2). Varios de los principios que aquí se describen para las proteínas enlazantes con oxígeno también son válidos para las enzimas que se han de estudiar en los capítulos 5 y 6. En esta sección se examina la química de la unión de oxígeno al hemo, la fisiología del enlazamiento de oxígeno a la mioglobina y hemoglobina, y las propiedades reguladoras de la hemoglobina.

A. Unión reversible del oxígeno al hemo

Se recurrirá al uso de la mioglobina como ejemplo de enlazamiento de oxígeno al grupo prostético hemo. Los mismos principios se aplican a la hemoglobina. La unión reversible del oxígeno se llama **oxigenación**. La mioglobina sin oxígeno se llama desoximioglobina, y la molécula con oxígeno se llama oximioglobina. (Las dos formas de hemoglobina se llaman desoxihemoglobina y oxihemoglobina).

Algunos sustituyentes del grupo prostético hemo son hidrofóbicos; esta propiedad permite que el grupo prostético esté sepultado parcialmente en el interior hidrofóbico de la molécula de mioglobina. Recuérdese que, en la figura 4.40, hay dos residuos polares, His-64 y His-93, situados cerca del grupo hemo. En la oximioglobina se coordinan seis ligandos al hierro ferroso y los ligandos tienen geometría octaédrica en torno al catión metálico (figuras 4.44 y 4.45). Cuatro de los ligandos son los átomos de nitrógeno del sistema anular de tetrapirrol; el quinto ligando es un nitrógeno de imidazol de His-93 (llamado histidina proximal) y el sexto ligando es oxígeno molecular unido entre el hierro y la cadena lateral de imidazol, del His-64 (llamado histidina distal). En la desoximioglobina el hierro sólo se coordina con cinco ligandos porque no hay oxígeno. Las cadenas laterales no polares de Val-68 y Phe-43, que se ven en la figura 4.45, contribuyen a la hidrofobicidad de la bolsa de enlace con el oxígeno y ayudan a mantener en su lugar al grupo hemo. Varias cadenas laterales bloquean la entrada a la bolsa que contiene al hemo, tanto en la oximioglobina como en la desoximioglobina. En esta región la estructura de la proteína debe vibrar, o respirar, con rapidez para permitir que el oxígeno se enlace y se disocie.

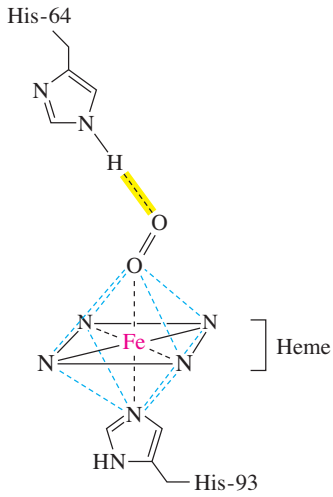


Figura 4.44 ▲
Sitio de unión de oxígeno en la oximioglobina de esperma de ballena. El grupo prostético hemo se representa por un paralelogramo con un átomo de nitrógeno en cada vértice. Las líneas entrecortadas azules ilustran la geometría octaédrica del complejo de coordinación. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

La hendidura hidrofóbica del polipéptido globina es la clave de la capacidad que presentan la mioglobina y la hemoglobina para unirse y liberar oxígeno en forma adecuada. En soluciones acuosas, el hemo libre no se une en forma reversible con el oxígeno; en su lugar, el Fe(II) del hemo se oxida casi instantáneamente a Fe(III). (Oxidación equivale a la pérdida de un electrón, como se describirá en la sección 6.1C. La reducción es la ganancia de un electrón. Oxidación y reducción se refieren a la transferencia de electrones y no a la presencia o ausencia de moléculas de oxígeno).

La estructura de la mioglobina y la hemoglobina evita la transferencia permanente de un electrón, u oxidación irreversible, asegurando así la unión reversible de oxígeno molecular para su transporte. En la hemoglobina el átomo de hierro ferroso se oxida parcialmente cuando se enlaza O_2. Un electrón se transfiere en forma temporal hacia

el átomo de oxígeno unido al hierro, por lo que la molécula de dioxígeno se reduce parcialmente. Si el electrón se transfiriera por completo al oxígeno, el complejo sería $Fe^{3+}—O_2^{\ominus}$ (anión superóxido unido al hierro férrico). La hendidura de la globina evita la transferencia completa del electrón y fuerza el retorno del electrón al átomo de hierro cuando el O_2 se disocia.

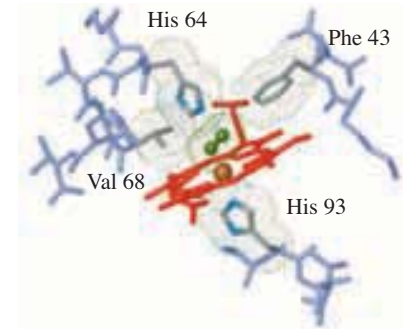


Figura 4.45 ▲
Sitio de enlace con oxígeno en la mioglobina de esperma de ballena. El Fe(II) (naranja) está en el plano del grupo hemo. El oxígeno (verde) se une al átomo de hierro, y la cadena lateral de aminoácido de His-64, Val-68 y Phe-43 aportan al ambiente hidrofóbico del sitio enlazante con oxígeno. [PDB 1AGM]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

B. Curvas de unión de mioglobina y hemoglobina con el oxígeno

El oxígeno se une en forma reversible a la mioglobina y a la hemoglobina. El grado de enlace en el equilibrio depende de la concentración de la proteína y del oxígeno. Esta relación se ilustra en las curvas de unión con oxígeno (figura 4.46). En esas figuras, la saturación fraccionaria (Y) de una cantidad fija de proteína se grafica en función de la concentración del oxígeno (expresada como presión parcial de oxígeno gaseoso, pO_2). La saturación fraccionaria de mioglobina o hemoglobina es la fracción de la cantidad total de moléculas que se oxigenan.

$$Y = \frac{[MbO_2]}{[MbO_2] + [Mb]} \qquad \textbf{(4.1)}$$

La curva de unión de la mioglobina es hiperbólica (figura 4.46), lo que indica que hay una sola constante de equilibrio para el enlace de O_2 a la macromolécula. En contraste, la curva que describe la relación entre la concentración de oxígeno y el enlace a la hemoglobina es sigmoidea. Las curvas sigmoideas (en forma de S) de unión indican

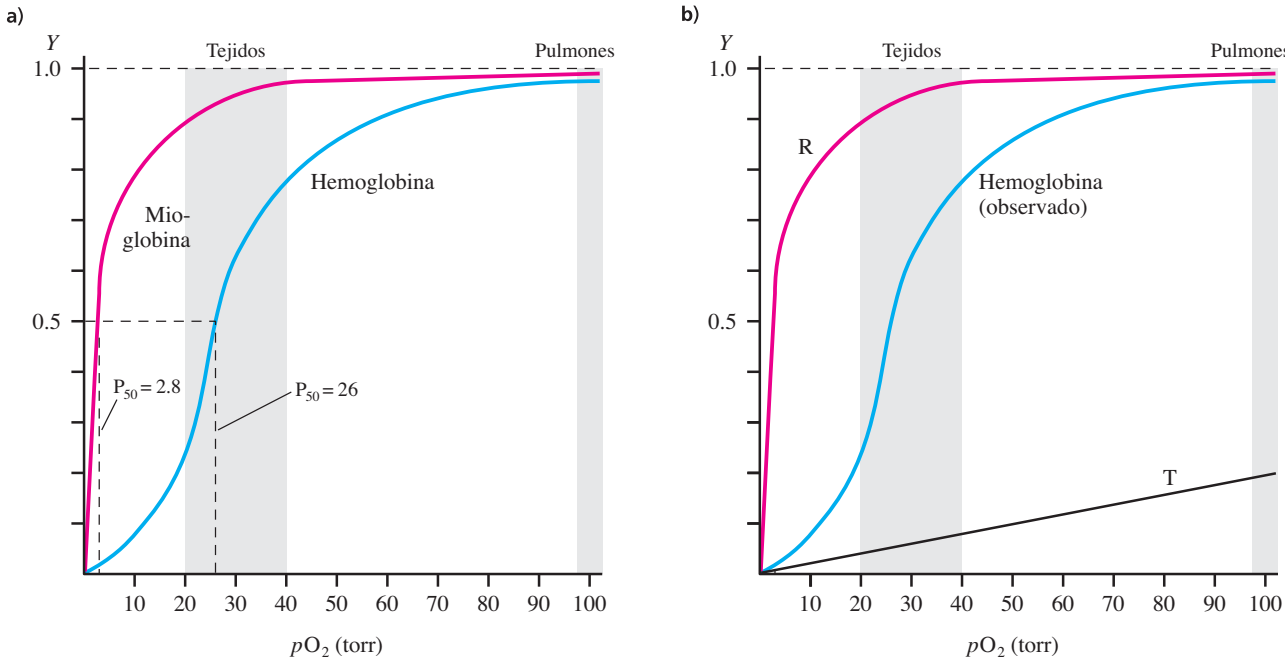


Figura 4.46 ▲
Curvas de enlazamiento de oxígeno de mioglobina y hemoglobina. **a)** Comparación entre mioglobina y hemoglobina. La saturación fraccionaria (Y) de cada proteína se grafica contra la presión parcial del oxígeno (pO_2). La curva de enlace de la mioglobina con oxígeno es hiperbólica, y la mitad de la saturación ($Y = 0.5$) se alcanza a una presión de oxígeno de 2.8 torr. La curva de enlace de la hemoglobina con oxígeno en la sangre entera es sigmoidea, y la mitad de la saturación sucede a una presión parcial de oxígeno de 26 torr. La mioglobina tiene mayor afinidad por el oxígeno que la hemoglobina a todas las presiones de oxígeno. En los pulmones, donde la presión parcial de oxígeno es alta, la hemoglobina casi está saturada con oxígeno. En los tejidos, donde la presión parcial de oxígeno es baja, la hemoglobina oxigenada libera oxígeno y se transfiere a la mioglobina. **b)** Enlazamiento de distintos estados de hemoglobina con oxígeno. El estado oxi (R, o de alta afinidad) tiene una curva hiperbólica de enlazamiento. El estado desoxi (T, o de baja afinidad) también tendría una curva de unión hiperbólica, pero con mucha mayor concentración para conseguir la mitad de la saturación. Las soluciones de hemoglobina que contienen mezclas de baja y alta afinidad producen curvas sigmoideas de enlazamiento, con diversas afinidades intermedias para el oxígeno.

que hay más de una molécula de ligando que se une a cada proteína. En este caso, hasta cuatro moléculas de O_2 se unen con la hemoglobina, una por grupo hemo de la proteína tetramérica. La forma de la curva indica que los sitios de unión con oxígeno en la hemoglobina interaccionan de tal modo que el enlace de una molécula de oxígeno a un grupo hemo facilita la unión de moléculas sucesivas de oxígeno a los otros hemo. La afinidad de la hemoglobina hacia el oxígeno aumenta a medida que se le une cada molécula de oxígeno. Este fenómeno de enlace interactivo se llama cooperatividad positiva del enlace.

La presión parcial a media saturación (P_{50}) es una medida de la afinidad de la proteína hacia el O_2. Una P_{50} baja indica una gran afinidad al oxígeno porque la proteína está medio saturada con oxígeno a baja concentración del mismo; en forma similar, una P_{50} alta indica que la afinidad es baja. Las moléculas de mioglobina están medio saturadas a una pO_2 de 2.8 torr (1 atmósfera = 760 torr). La P_{50} de la hemoglobina es mucho mayor (26 torr) y refleja su menor afinidad hacia el oxígeno. Los grupos prostéticos hemo de la mioglobina y la hemoglobina son idénticos, pero las afinidades de tales grupos con el oxígeno son distintas porque los microambientes que permiten las proteínas son un poco distintos. La afinidad con oxígeno es una propiedad intrínseca de la proteína. Es parecida a las constantes de equilibrio de combinación/disociación que se usan con frecuencia para describir el enlace de ligandos a otras proteínas y enzimas.

Como la figura 4.46 muestra, a la alta pO_2 que hay en los pulmones, de unos 100 torr, tanto la mioglobina como la hemoglobina están casi saturadas. No obstante, a valores de pO_2 inferiores a unos 50 torr la mioglobina todavía está casi saturada, mientras que la saturación de la hemoglobina sólo es parcial. Dentro de los capilares tisulares, donde la pO_2 es baja (de 20 a 40 torr), se libera gran parte del oxígeno transportado por la hemoglobina de los eritrocitos. En el tejido muscular, la mioglobina se une al oxígeno liberado por la hemoglobina. Las distintas afinidades de la mioglobina y la hemoglobina hacia el oxígeno producen un sistema eficiente de suministro del oxígeno, desde los pulmones hasta los músculos.

El enlazamiento cooperativo del oxígeno por parte de la hemoglobina se relaciona con cambios de conformación de la proteína, que suceden en la oxigenación. La desoxihemoglobina se estabiliza por varios pares de iones dentro y entre subunidades. Cuando el oxígeno se une a una de las subunidades, causa un movimiento que altera esos pares de iones y favorece una conformación un poco diferente. El movimiento se activa por la reactividad del átomo de hierro en el hemo (figura 4.47). En la desoxihemoglobina, el átomo de hierro sólo está unido a cinco ligandos (como en la mioglobina). Su cavidad es un poco mayor que la que existe en el interior del anillo de porfirina y está abajo del plano de ese anillo. Cuando el O_2 —que es el sexto ligando— se enlaza con el átomo de hierro, cambia la estructura electrónica del hierro, disminuye su diáme-

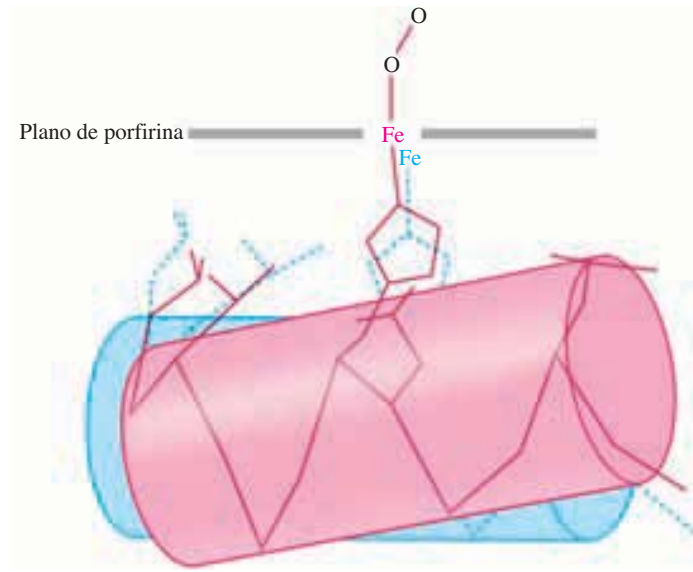


Figura 4.47 ▶
Cambios de conformación en una cadena de hemoglobina inducidos por oxigenación. Cuando se oxigena el hierro hemo de una subunidad de hemoglobina (gris oscuro), el residuo proximal de histidina se recoge hacia el anillo de porfirina. La hélice que contiene a la histidina también desplaza su posición, interrumpiendo los pares de iones que forman enlaces cruzados entre las subunidades de desoxihemoglobina (gris claro).

tro y entra al plano del anillo de porfirina, tirando de la hélice que contiene la histidina proximal. El cambio de estructura terciaria da como resultado un pequeño cambio de estructura cuaternaria, que permite que las subunidades restantes se combinen con más facilidad con el oxígeno. Todo el tetrámero parece desplazarse desde la conformación desoxi a la oxi, sólo después que al menos una molécula de oxígeno se enlaza a cada dímero $\alpha\beta$. (Véase la sección 5.10C, con más detalles de este aspecto).

El cambio de conformación de la hemoglobina es el causante de la cooperatividad positiva del enlazamiento que se observa en la curva de unión (figura 4.46a). La forma de la curva se debe al efecto combinado de las dos conformaciones (figura 4.46b). La forma totalmente desoxigenada de la hemoglobina presenta poca afinidad hacia el oxígeno, por lo que produce una curva de unión hiperbólica con una concentración muy alta en la media saturación. Sólo se satura una cantidad pequeña de hemoglobina a bajas concentraciones de oxígeno. Al aumentar la concentración de oxígeno, algunas de las moléculas de hemoglobina se combinan con una molécula de oxígeno, lo cual aumenta su afinidad para el oxígeno, y es más probable que se unan a un oxígeno adicional. Esto produce la curva sigmoidea y también un aumento brusco en el enlazamiento. Hay más moléculas de hemoglobina en la conformación oxi. Si todas las moléculas de hemoglobina tuvieran la conformación oxi, su solución produciría una curva de unión hiperbólica. La liberación de las moléculas de oxígeno permite que la molécula de hemoglobina vuelva a formar los pares de iones y recupere la conformación desoxi.

Las dos conformaciones de la hemoglobina se llaman estados T (tenso) y R (relajado), usando la terminología normal para dichos cambios de conformación. En la hemoglobina, la conformación desoxi, que se resiste al enlazamiento con oxígeno, se considera que es el estado inactivo (T), y a la conformación oxi, que facilita la unión con oxígeno, se le considera estado activo (R). Los estados R y T están en equilibrio dinámico.

C. Hemoglobina como proteína alostérica

La unión y liberación del oxígeno y la hemoglobina se regulan con **interacciones alostéricas** (de *allos*, otro en griego). A este respecto, la hemoglobina, que es una proteína portadora y no una enzima, se parece a ciertas enzimas reguladoras (sección 5.9). Las interacciones alostéricas se presentan cuando una molécula pequeña específica, llamada **modulador alostérico** o **efector alostérico**, se une a una proteína (que por lo general es una enzima) y modifica su actividad. El modulador alostérico se enlaza en forma reversible en un sitio separado del sitio de enlace funcional de la proteína. Una molécula efectora puede ser activadora o inhibidora. Una proteína cuya actividad es modulada por efectores alostéricos se llama **proteína alostérica**.

La modulación alostérica se logra mediante cambios pequeños, pero importantes, en las conformaciones de las proteínas alostéricas. Consiste en cooperatividad de enlace regulada por la unión del efector alostérico a un sitio diferente, que no se traslape con el sitio normal de enlace de un sustrato, producto o molécula transportada, como la de oxígeno. Una proteína alostérica se encuentra en un equilibrio en el que su forma activa (estado R) y su forma inactiva (estado T) están en interconversión rápida. Un sustrato, que se une obviamente al sitio activo (al hemo en la hemoglobina), se une con más avidez cuando la proteína se halla en el estado R. Un inhibidor alostérico, que se une en un sitio alostérico o regulador, lo hace con más avidez con el estado T. El enlace de un inhibidor alostérico con su sitio propio determina que la proteína alostérica cambie con rapidez del estado R al T. El enlace de un sustrato con el sitio activo (o de un activador alostérico al sitio alostérico) causa el cambio inverso. El cambio de conformación de una proteína alostérica causado por la unión o la liberación de un efector se extiende desde el sitio alostérico hasta el sitio funcional de enlace (el sitio activo). El grado de actividad de una proteína alostérica depende de las proporciones de las moléculas que hay en las formas R y T, las cuales a su vez dependen de las concentraciones relativas de sustratos y moduladores que se unen a cada forma.

En la figura 4.48 se muestra la molécula de 2,3-*bis*fosfo-D-glicerato (2,3BPG), que es un efector alostérico de la hemoglobina de mamíferos. La presencia de 2,3BPG en los eritrocitos eleva la P_{50} de enlace de oxígeno a la hemoglobina de adulto hasta aproximadamente 26 torr —mucho mayor que la P_{50} de unión de oxígeno a hemoglobina

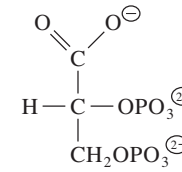


Figura 4.48 ▲
2,3-*B*isfosfo-D-glicerato (2,3BPG).

purificada en solución acuosa (unos 12 torr). En otras palabras, el 2,3BPG en los eritrocitos reduce en forma apreciable la afinidad de la desoxihemoglobina hacia el oxígeno. Las concentraciones de 2,3BPG y de hemoglobina en el interior de los eritrocitos son casi iguales (Aprox. 4.7 mM).

En la cavidad central de la hemoglobina, entre las dos subunidades β, hay seis cadenas laterales con carga positiva y el grupo α-amino N-terminal de cada cadena β. Éstos forman un sitio catiónico de unión (figura 4.49). En la desoxihemoglobina tales grupos con carga positiva pueden interactuar en forma electrostática con las cinco cargas negativas del 2,3BPG. Cuando se enlaza el 2,3BPG, la conformación desoxi se estabiliza (el estado T, que muestra poca afinidad hacia O_2), y se inhibe la conversión en la conformación oxi (el estado R, o de gran afinidad). En la oxihemoglobina, las cadenas β están más cerca entre sí, y el sitio alostérico de unión es demasiado pequeño para que quepa el 2,3BPG. Los ligandos O_2 y 2,3BPG, unidos reversiblemente ejercen efectos opuestos sobre el equilibrio R $\rightleftharpoons$ T. La unión con oxígeno aumenta la proporción de moléculas de hemoglobina en la conformación oxi (R), y el 2,3BPG aumenta la proporción de moléculas de hemoglobina en la conformación desoxi (T). Como el oxígeno y el 2,3BPG tienen sitios de unión diferentes, el 2,3BPG es un efector alostérico.

En el recuadro 11.3 se describe la síntesis del 2,3BPG.

En ausencia de 2,3BPG, la hemoglobina está casi saturada a una presión aproximada de oxígeno de 20 torr. Así, a la baja presión parcial de oxígeno que impera en los tejidos (de 20 a 40 torr), la hemoglobina sin 2,3BPG no descargaría su oxígeno. Por ello, en presencia de 2,3BPG equimolar, la hemoglobina sólo está saturada la tercera parte, aproximadamente, a 20 torr. El efecto alostérico del 2,3BPG determina que la hemoglobina libere oxígeno a las bajas presiones parciales de oxígeno que imperan en los tejidos. En los músculos, la mioglobina puede unirse a algo del oxígeno que se libera.

Hay una regulación adicional del enlazamiento de oxígeno a la hemoglobina donde intervienen dióxido de carbono y protones, ambos productos del metabolismo aeróbico. El CO_2 hace disminuir la afinidad de la hemoglobina hacia el O_2 al hacer descender el pH en el interior de los glóbulos rojos. La hidratación del CO_2 catalizada por enzimas en los eritrocitos forma ácido carbónico, H_2CO_3, que se disocia y forma bicarbonato y un protón, con lo cual desciende el pH.

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons H^{\oplus} + HCO_3^{\ominus} \qquad \textbf{(4.2)}$$

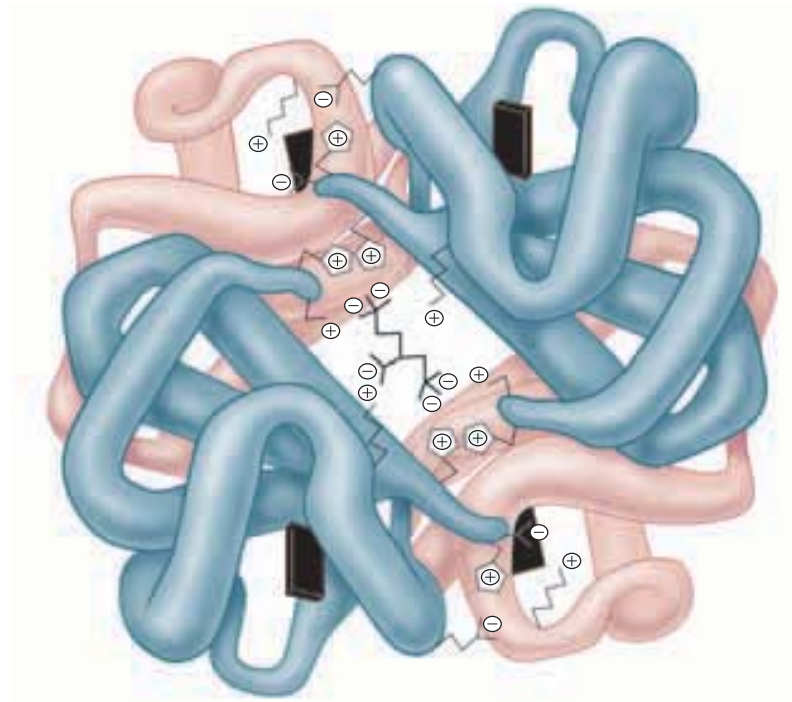


Figura 4.49 ▶
Unión de 2,3BPG con desoxihemoglobina. La cavidad central de la desoxihemoglobina se alinea con grupos de carga positiva, complementarios de los grupos carboxilato y fosfato del 2,3BPG. Tanto el 2,3BPG como los pares de iones que se muestran ayudan a estabilizar la conformación desoxi. Las subunidades α se muestran en gris claro, las subunidades β en gris oscuro, y los grupos prostéticos hemo en negro.

El pH menor causa la protonación de varios grupos en la hemoglobina; entonces, esos grupos forman pares de iones que ayudan a estabilizar la conformación desoxi. El aumento en la concentración de CO_2 y la disminución concomitante de pH elevan la P_{50} de la hemoglobina (figura 4.50). Este fenómeno se llama efecto Bohr y aumenta la eficiencia del sistema de suministro de oxígeno. Al inhalar los pulmones, cuando la concentración del CO_2 es baja, la hemoglobina toma con facilidad el O_2; en los tejidos metabolizantes, donde la concentración de CO_2 es relativamente alta y el pH es relativamente bajo, la oxihemoglobina descarga con facilidad el O_2.

El dióxido de carbono es transportado desde los tejidos hasta los pulmones en dos maneras. La mayor parte del CO_2 producido por el metabolismo se transporta en forma de iones bicarbonato disueltos. Empero, algo de dióxido de carbono es transportado por la hemoglobina misma en forma de aductos de carbamato (figura 4.51). Al pH de los glóbulos rojos (7.2) y a altas concentraciones de CO_2, los grupos amino no protonados de los cuatro residuos N-terminales de la desoxihemoglobina (valores de pK_a entre 7 y 8) pueden reaccionar en forma reversible con el CO_2 y formar aductos de carbamato. Los carbamatos de oxihemoglobina son menos estables que los de la desoxihemoglobina. Cuando la hemoglobina llega a los pulmones, donde la presión parcial del CO_2 es baja y la presión parcial del O_2 es alta, la hemoglobina se convierte en su estado oxigenado y se libera el CO_2 que estaba unido a ella.

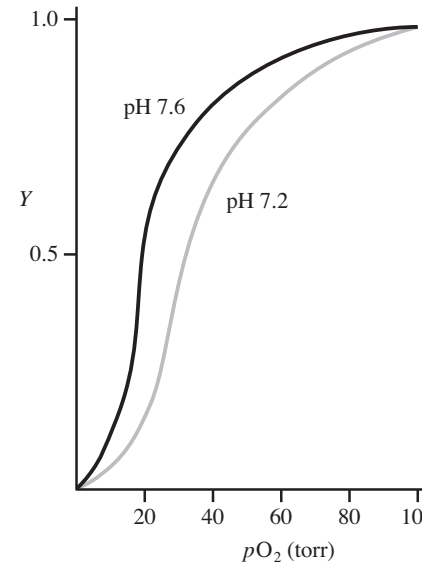


Figura 4.50 ▲
Efecto Bohr. Al descender el pH disminuye la afinidad de la hemoglobina hacia el oxígeno.

4.14 Los anticuerpos se unen a antígenos específicos

Los vertebrados poseen un sistema inmunitario complicado que elimina sustancias extrañas como bacterias y virus infecciosos. Como parte de este sistema de defensa, los vertebrados sintetizan las proteínas llamadas **anticuerpos** (llamadas también inmunoglobulinas), que reconocen y se unen en forma específica con **antígenos**. Muchos tipos diferentes de compuestos extraños pueden ser antígenos, que producen una respuesta inmune o inmunitaria. Los anticuerpos son sintetizados por los glóbulos blancos, llamados también linfocitos; cada linfocito y sus descendientes sintetizan el mismo anticuerpo. Como los animales están expuestos a muchas sustancias extrañas durante sus vidas, desarrollan un conjunto gigantesco de linfocitos productores de anticuerpos, que persisten durante muchos años a bajas concentraciones, y después pueden responder al antígeno durante una reinfección. La memoria del sistema inmunitario es la razón por la que no se repiten ciertas infecciones en un individuo, a pesar de su exposición repetida. Las vacunas (agentes patógenos inactivados o análogos de toxinas) administradas a los niños son eficaces porque la inmunidad adquirida en la niñez perdura toda la adultez.

Cuando un antígeno —sea nuevo o ya encontrado— se une a la superficie de los linfocitos, que son estimulados para proliferar y producir anticuerpos solubles que se secretan hacia el torrente sanguíneo. Los anticuerpos solubles se unen al microorganismo o sustancia extraños y forman complejos antígeno-anticuerpo que precipitan y marcan el antígeno para su destrucción mediante una serie de proteasas que interactúan, o por los linfocitos que engullen al antígeno y lo digieren en su interior.

Los anticuerpos más abundantes en el torrente sanguíneo son de la clase de la inmunoglobulina G (IgG). Son oligómeros en forma de Y formados por dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas unidas por puentes de disulfuro (figura 4.52, página 124). Las inmunoglobulinas son glicoproteínas; contienen carbohidratos unidos en forma covalente a las cadenas pesadas. Los pares de N-terminales de las cadenas ligeras y pesadas están cercanos entre sí. Las cadenas ligeras contienen dos dominios y las cadenas pesadas cuatro. Todos los dominios consisten en aproximadamente 110 residuos ensamblados en un motivo común llamado plegamiento de inmunoglobulinas. La propiedad característica del plegamiento de inmunoglobulinas es un emparedado formado por dos láminas β antiparalelas (figura 4.53, página 124). Esta estructura de dominio se encuentra en muchas otras proteínas del sistema inmune.

Los dominios N-terminales de los anticuerpos, llamados dominios variables debido a su diversidad de secuencias, determinan la especificidad de unión con antígenos. Con estudios de cristalografía de rayos X se ha demostrado que el sitio de unión con el antígeno de un dominio variable consiste en tres asas llamadas regiones hipervariables,

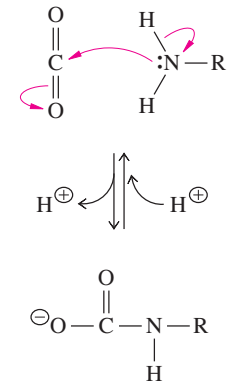


Figura 4.51 ▲
Aducto de carbamato. El dióxido de carbono producido en los tejidos metabolizantes puede reaccionar en forma reversible con los residuos N-terminales de las cadenas de globina en la hemoglobina y los convierte en aductos de carbamato.

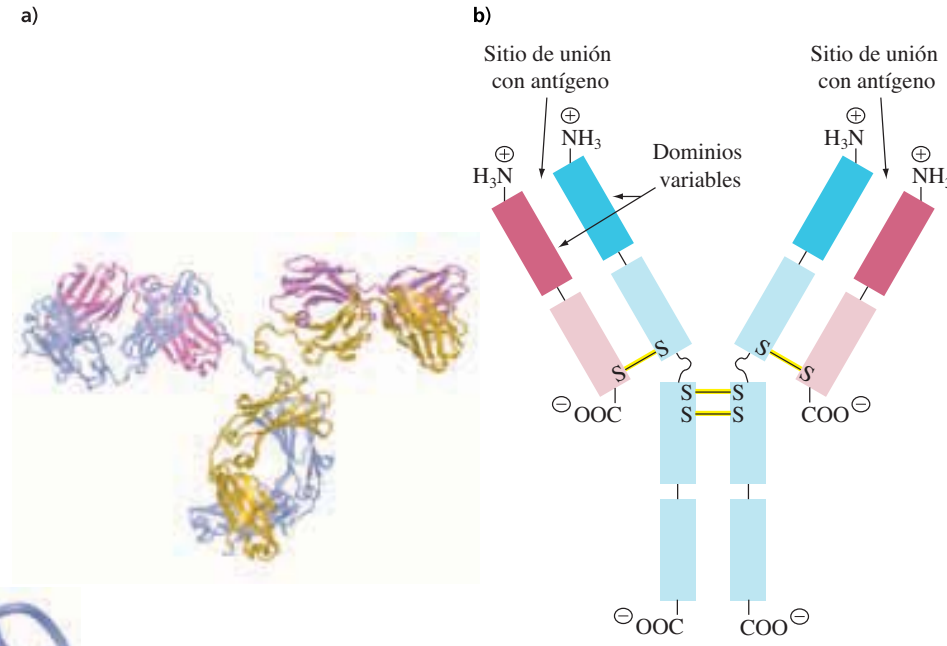


Figura 4.52 ▶
Estructura de un anticuerpo humano. **a)** Estructura. **b)** Diagrama. Dos cadenas pesadas (azul) y dos ligeras (rojo) de anticuerpos, de la clase inmunoglobulina G, se unen por puentes de disulfuro (amarillos). Los dominios variables de las cadenas ligera y pesada (donde se une el antígeno) tienen colores más oscuros. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

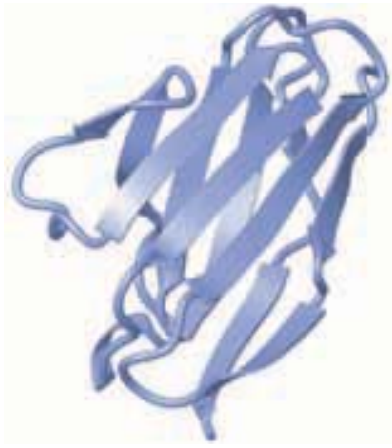


Figura 4.53 ▲
El plegamiento de inmunoglobulina. El dominio consiste en un emparedado de dos láminas β antiparalelas. [PDB 1REI].

que difieren mucho en tamaño y secuencia. Las asas forman una cadena ligera, y en una cadena pesada se combinan para formar un barril cuya superficie superior es complementaria a la forma y polaridad de un antígeno específico. La coincidencia entre el antígeno y el anticuerpo es tanta que no hay espacio para moléculas de agua entre los dos. Las fuerzas que estabilizan la interacción del antígeno y el anticuerpo son puentes de hidrógeno, de manera especial, así como interacciones electrostáticas. En la figura 4.54 se presenta un ejemplo de la interacción de anticuerpos con una proteína antigénica.

Debido a su notable especificidad de combinación con antígeno, los anticuerpos se usan en el laboratorio para detectar pequeñas cantidades de diversas sustancias. En un inmunoensayo común, un líquido con una cantidad desconocida de antígeno se mezcla con una solución de anticuerpo marcado y se mide la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo que se forma. La sensibilidad de dichos análisis se puede aumentar de diversas maneras, para adecuarlos a pruebas de diagnóstico.

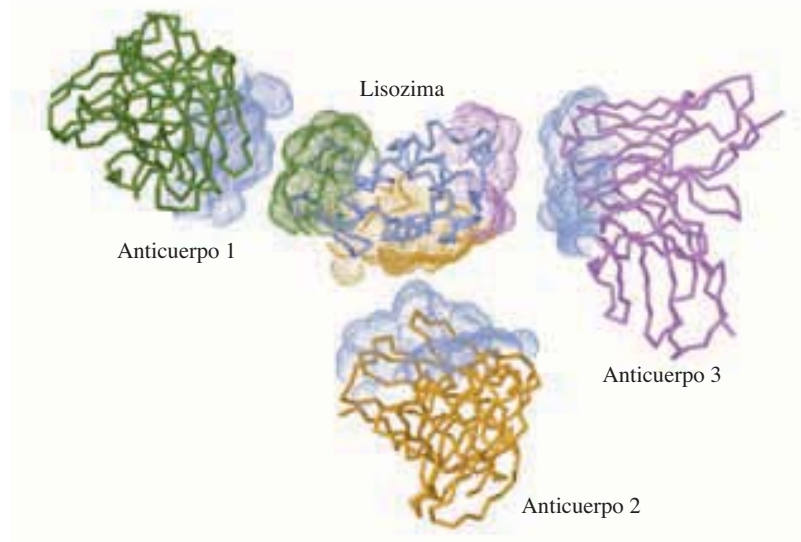


Figura 4.54 ▶
Enlazamiento de tres anticuerpos distintos con un antígeno (la proteína lisozima). Las estructuras de los tres complejos antígeno-anticuerpo se han determinado con cristalografía de rayos X. Esta vista compuesta, donde se han separado el antígeno y los anticuerpos, muestra las superficies que interactúan del antígeno y anticuerpos. Sólo se muestran partes de los tres anticuerpos.

Resumen

1. Las proteínas globulares son solubles en agua, aproximadamente esféricas y en pliegues apretados. En general, las proteínas fibrosas son insolubles en agua y dan soporte mecánico a las células y los tejidos. Las proteínas de membrana son componentes integrales de las membranas o están asociadas a ellas.

2. Hay cuatro niveles de estructura en las proteínas: primario (secuencia de residuos de aminoácido), secundario (conformación local regular estabilizada por puentes de hidrógeno), terciario (forma compactada de toda la cadena de polipéptido) y cuaternario (ensamble de dos o más cadenas de polipéptido para formar una proteína con varias subunidades).

3. Las estructuras tridimensionales de biopolímeros como las proteínas pueden determinarse por cristalografía de rayos X y espectroscopia de RMN.

4. El grupo peptídico es polar y plano. La rotación respecto a los enlaces N—Cα y Cα—C se describe mediante ϕ y ψ.

5. La hélice α, una estructura secundaria común, es una espiral que contiene unos 3.6 residuos de aminoácido por vuelta. Los puentes de hidrógeno entre los hidrógenos de amida y los oxígenos carbonílicos son aproximadamente paralelos al eje de la hélice.

6. El otro tipo frecuente de estructura secundaria es la estructura β, que suele consistir en hebras β paralelas o antiparalelas que están unidas entre sí por puentes de hidrógeno formando láminas β.

7. La mayor parte de las proteínas tiene tramos de conformación no repetitiva, incluyendo giros y asas que conectan hélices α y hebras β. Las combinaciones reconocibles de elementos estructurales secundarios se llaman motivos.

8. La estructura terciaria de las proteínas consiste en uno o más dominios que pueden ser estructuras reconocibles y pueden estar asociadas con determinadas funciones.

9. En las proteínas que poseen estructura cuaternaria, las subunidades se mantienen unidas en general por interacciones no covalentes.

10. La conformación nativa de una proteína puede alterarse por adición de agentes desnaturalizantes. Es posible la renaturalización bajo ciertas condiciones.

11. El plegamiento de una proteína para ir a su estado biológicamente activo es un proceso secuencial y cooperativo al que impulsa sobre todo el efecto hidrofóbico. El plegamiento puede estar asistido por chaperones.

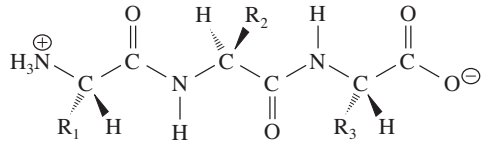
12. La colágena es la principal proteína fibrosa de los tejidos conectivos. Las tres cadenas helicoidales izquierdas de la colágena forman una superhélice derecha.

13. Las estructuras compactas y dobladas de las proteínas les permiten unirse en forma selectiva a otras moléculas. Las proteínas mioglobina y hemoglobina, que contienen hemos, se unen y liberan el oxígeno. El enlazamiento de oxígeno con hemoglobina se caracteriza por la cooperatividad positiva y la regulación alostérica.

14. Los anticuerpos son proteínas de multidominio que se unen con sustancias extrañas o antígenos marcándolas para su destrucción. Los dominios variables en los extremos de las cadenas pesadas y ligeras interactúan con el antígeno.

Problemas

1. Examine el siguiente tripéptido:



a) Marque los átomos de carbono α y trace cuadros en torno a cada grupo peptídico.
b) ¿Que representan los grupos R?
c) ¿Por qué hay rotación limitada en torno a los enlaces de C=O de carbonilo con N de amida?
d) Suponiendo que la estructura química represente la conformación correcta del enlace peptídico, los grupos peptídicos ¿están en la conformación *cis* o *trans*?
e) ¿Cuáles enlaces permiten la rotación de grupos peptídicos entre sí?

2. a) Caracterice la pauta de puentes de hidrógeno de: 1) una hélice α y 2) una triple hélice de colágena.
b) Explique cómo se ordenan las cadenas laterales de aminoácidos en cada una de esas hélices.

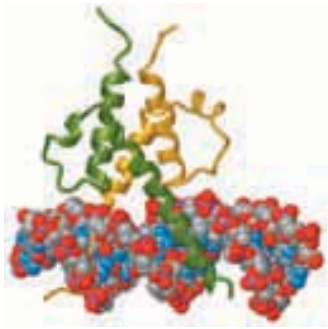
3. Explique por qué los residuos de 1) glicina y 2) de prolina no se encuentran con frecuencia en las hélices α.

4. Se diseñó un polipéptido de 20 aminoácidos llamado betanova, la cual es una molécula pequeña y soluble que en teoría forma estructuras estables de lámina β en ausencia de puentes de disulfuro. Una RMN de betanova en solución indica que de hecho sí forma una lámina β antiparalela de tres hebras. Si la secuencia de la betanova es la que se muestra abajo:

a) Trace un diagrama de cinta de la betanova que indique los residuos probables para que se forme cada giro de horquilla entre las hebras β.
b) Muestre las interacciones que cabe esperar estabilicen esta estructura de lámina β.

Betanova RGWSVQNGKYTNNGKTTEGR

5. Cada miembro de una importante familia de 250 proteínas enlazantes con ADN está formado por un dímero con un motivo común de proteína. Este motivo permite que cada proteína enlazante con ADN reconozca y se una con secuencias específicas de ADN. ¿Cuál es el motivo común de proteína en la estructura que sigue?



(***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

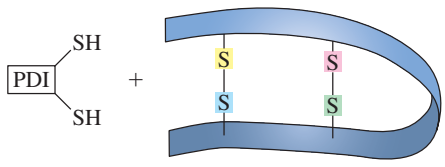
6. Para contestar lo siguiente, vea la figura 4.20.

a) ¿A cuál de las cuatro categorías principales de dominio pertenece el dominio medio de la cinasa de piruvato (PK) (toda α, toda β, α/β o $\alpha + \beta$)?

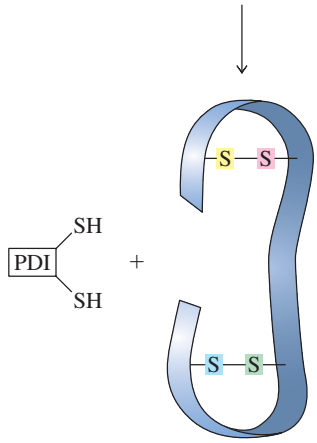
b) Describa todo "pliegue" de dominio característico que sea prominente en este dominio medio de la PK.

c) Identifique otras dos proteínas que tengan el mismo pliegue que el dominio medio de la cinasa de piruvato.

7. La proteína isomerasa de disulfuro (PDI) aumenta en forma marcada la rapidez de plegamiento correcto de la forma inactiva de la ribonucleasa con puentes de disulfuro aleatorios (figura 4.29). Indique el mecanismo de reordenamiento de una proteína no nativa (inactiva) con puentes de disulfuro incorrectos para formar la proteína nativa (activa) con puentes de disulfuro correctos, catalizado por PDI.



Ribonucleasa inactiva



Ribonucleasa activa

8. La mioglobina contiene ocho hélices α y una de ellas tiene la siguiente secuencia:

–Gln–Gly–Ala–Met–Asn–Lys–Ala–Leu–Glu–
His–Phe–Arg–Lys–Asp–Ile–Ala–Ala–

¿Qué cadenas laterales están probablemente en el lado de la hélice que se dirige hacia el interior de la proteína? ¿Cuáles son más probables de dirigirse hacia el solvente acuoso? Tenga en cuenta la distancia de los residuos que miran hacia el interior.

9. La homocisteína es un α-aminoácido que contiene un grupo metileno más en su cadena lateral que la cisteína (cadena lateral = —CH_2CH_2SH). La homocisteinuria es una enfermedad genética caracterizada por concentraciones elevadas de homocisteína en el plasma y en la orina, y también por deformidades esqueléticas debidas a defectos en la estructura de la colágena. La homocisteína reacciona con facilidad con la alisina bajo condiciones fisiológicas. Escriba esta reacción y sugiera cómo podría causar enlazamientos cruzados defectuosos en la colágena.

10. La forma larvaria del parásito *Schistosoma mansoni* infecta a los humanos penetrando por la piel. La larva segrega enzimas que catalizan la ruptura de los enlaces peptídicos entre los residuos X y Y en la secuencia –Gly–Pro–X–Y– (X y Y pueden ser cualquiera de los aminoácidos). ¿Por qué es importante esta actividad enzimática para el parásito?

11. a) ¿De qué forma la reacción del dióxido de carbono con el agua ayuda a explicar el efecto Bohr? Escriba la ecuación de la formación del ion bicarbonato a partir de CO_2 y agua, y explique los efectos del $H^{\oplus}$ y del CO_2 en la oxigenación de la hemoglobina.

b) Explique la base fisiológica de la administración intravenosa de bicarbonato a las víctimas de choque.

12. La hemoglobina fetal (Hb F) contiene serina en lugar de la histidina catiónica en la posición 143 de las cadenas β en la hemoglobina de adulto (Hb A). El residuo 143 ve hacia la cavidad central, entre las cadenas β.

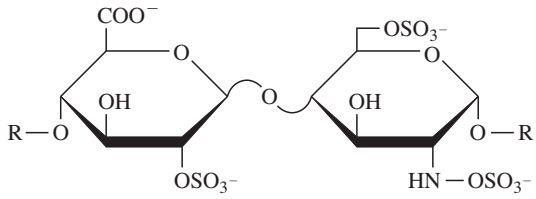
a) ¿Por qué el 2,3BPG se une con más fuerza a la desoxi Hb A que a la desoxi Hb F?

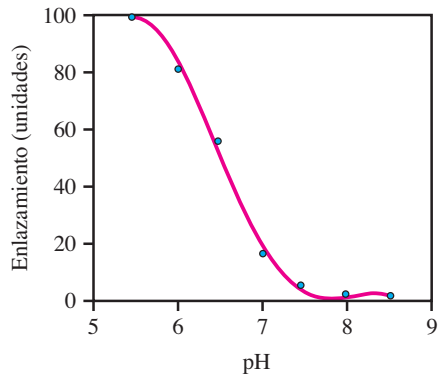
b) ¿Cómo afecta la menor afinidad de la Hb F hacia el 2,3BPG a la afinidad de la Hb F hacia el O_2?

c) La P_{50} de Hb F es 18 torr y la P_{50} de la Hb A es 26 torr. ¿Cómo explican estos valores la transferencia eficiente del oxígeno de la sangre materna al feto?

13. Las sustituciones de aminoácidos en las interfases de las subunidades $\alpha\beta$ en la hemoglobina pueden interferir con los cambios estructurales cuaternarios $R \rightleftharpoons T$ que suceden al enlazarse el oxígeno. En la variante de hemoglobina Hb_{Yakima}, la forma R se halla estabilizada en relación con la forma T y $P_{50} = 12$ torr. Explique por qué la hemoglobina mutante es menos eficiente que la normal ($P_{50} = 26$ torr) para suministrar oxígeno al músculo en acción, donde la pO_2 puede bajar hasta 10 a 20 torr.

14. La selenoproteína P es una rara proteína extracelular que contiene de 8 a 10 residuos de selenocisteína y dispone de alto contenido de residuos de cisteína e histidina. La selenoproteína P se encuentra como proteína plasmática y también como proteína fuertemente asociada con la superficie de las células. Se propone una asociación de la selenoproteína P con las células por interacción de la misma con carbohidratos de alto peso molecular clasificados como glicosaminoglucanas. Uno de esos compuestos es la heparina (véase la estructura siguiente). Se hicieron estudios de enlazamiento de selenoproteína P con heparina a distintas condiciones de pH. Los resultados se ven en la gráfica de abajo.





a) ¿En qué forma depende el enlazamiento de la selenoproteína P del pH?

b) Describa algunas posibles razones estructurales de la dependencia de unión. (*Sugerencia*: use la información acerca de cuáles aminoácidos son abundantes en la selenoproteína P).

[Adaptado de Arteel, G. E., Franken, S., Kappler, J., y Sies, H. (2000) *Biol. Chem.* 381:265-268].

15. El veneno de la tarántula Rose chilena (*Grammostola spatulata*) contiene una toxina que es una proteína con 34 aminoácidos. Se cree que es una proteína globular que se parte en la membrana lipídica para ejercer su efecto. La secuencia de la proteína es:

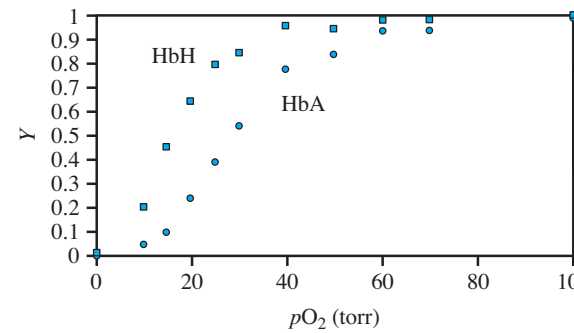
ECGKFMWKCKNSNDCCKDLVCSSRWKWCVLASPF

a) Identifique los aminoácidos hidrofóbicos y los muy hidrofílicos que haya en la proteína.

b) Se cree que la proteína tiene una cara hidrofóbica que interactúa con la membrana de lípido. ¿Cómo pueden interactuar los aminoácidos hidrofóbicos muy alejados en la secuencia y formar una cara hidrofóbica?

[Adaptado de Lee, S. y MacKinnon, R. (2004) Nature 430:232-235].

16. La Hb Helsinki (HbH) es una hemoglobina mutante en la que se ha sustituido la lisina en la posición 82 por metionina. La mutación se encuentra en la cadena beta y el residuo 82 en la cavidad central de la hemoglobina. Las curvas de enlazamiento con oxígeno para la hemoglobina de adulto normal (HbA, ●) y de HbH (■) a pH 7.4 en presencia de una concentración fisiológica de 2,3-BPG se ven en la gráfica siguiente. Explique por qué la curva de HbH está desplazada respecto a la de HbA. Esta mutación ¿estabiliza el estado R o el T? ¿Qué resultado tiene esta mutación sobre la afinidad hacia el oxígeno?



[Adaptado de Ikkala, E., Koskela, J., Pikkarainen, P., Raihala, E.L., El-Hazmi, M.A., Nagai, K., Lang, A., y Lehmann, H. *Acta Haematol.* (1976) 56:257-75].

Lecturas seleccionadas

Generalidades

Creighton, T. E. (1993). *Proteins: Structures and Molecular Properties*, 2ª Ed. (New York: W. H. Freeman). Capítulos 4 a 7.

Fersht, A. (1998). *Structure and Mechanism in Protein Structure* (New York: W. H. Freeman).

Goodsell, D. y Olson, A. J. (1993). Soluble proteins: size, shape, and function. *Trens Biochem. Sci.* 18:65-68.

Kyte, J. (1995). *Structure in Protein Chemistry* (New York: Garland).

Estructura de las proteínas

Branden, C., y Tooze, J. (1991). *Introduction to Protein Structure* (New York: Garland). Una descripción detallada de las estructuras tridimensionales de las proteínas, con base en análisis cristalográficos con rayos X.

Clothia, C., Hubbard, T., Brenner, S., Barns, H. y Murzin, A. (1997). Protein folds in the all-β and all-α classes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26:597-627.

Harper, E. T., y Rose, G. D. (1993). Helix stop signals in proteins and peptides: the capping box. *Biochemistry* 32:7605-7609.

Rhodes, G. (1993). *Crystallography Made Crystal Clear* (San Diego: Academic Press). Una introducción a la cristalografía con rayos X, y una guía de empleo para modelos cristalográficos.

Richardson, J. S., y Richardson, D. C. (1989). Principles and patterns of protein conformation. En *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation*, G. D. Fasman, Ed. (New York: Plenum), Págs. 1 a 98. Un excelente repaso de las estructuras secundarias y terciarias de proteínas globulares.

Plegamiento y estabilidad de proteínas

Daggett, V., y Fersht, A.R. (2003). Is there a unifying mechanism for protein folding? *Trends Biochem. Sci*. 28:18-25.

Feldman, D. E., y Frydman, J. (2000). Protein folding *in vivo*, the importance of molecular chaperones. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10:26-33.

Matthews, B. W. (1993). Structural and genetic analysis of protein stability. *Annu. Rev. Biochem*. 62:139-160.

Saibil, H.R., y Ranson, N.A. (2002). The chaperonin folding machine. *Trends Biochem. Sci*. 27:627-632.

Sigler, P. B., Xu, Z., Rye, H. S., Burston, S. G., Fenton, W. A. y Horwich, A. L. (1998). Structure and function in GroEL-mediated protein folding. *Annu. Rev. Biochem*. 67:581-608.

Smith, C.A. (2000). How Do Proteins Fold? *Biochem. Ed.* 28:76-79.

Proteínas específicas

Ackers, G. K., Doyle, M. L., Myers, D., y Daugherty, M. A. (1992). Molecular code for cooperativity in hemoglobin. *Science* 255:54-63.

Davies, D. R., Padlan, E. A., y Sheriff, S. (1990). Antibody-antigen complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 59:439-473. Describe las estructuras tridimensionales de complejos antígeno-anticuerpo.

Eaton, W. A., Henry, E. R., Hofrichter, J., y Mozzarelli, A. (1999). Is cooperative binding by hemoglobin really understood? *Nature Struct. Biol.* 6(4):351-357.

Kadler, K. (1994). Extracellular matrix 1: fibril-forming collagens. *Protein Profile* 1: 519-549.

Perutz, M. F. (1978). Hemoglobin structure and respiratory transport. *Sci. Am.* 239(6):92-125.

Perutz, M. F., Wilkinson, A. J., Paoli, M., y Dodson, G. G. (1998). The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisited. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27:1-34.

5

capítulo
cinco

Propiedades de las enzimas

Se ha tenido la ocasión de comprobar de qué manera las formas tridimensionales de las proteínas les permiten desempeñar papeles estructurales y de transporte. Ahora se describirán sus funciones como enzimas. Las enzimas son catalizadores biológicos selectivos de una eficiencia extraordinaria. Toda célula viva dispone de cientos de enzimas distintas que catalizan las reacciones esenciales para la vida. Aun los organismos vivos más simples contienen múltiples copias de cientos de enzimas diferentes. En los organismos multicelulares, el complemento de las enzimas varía de un tipo celular a otro. La mayor parte de las enzimas que se describen en este libro pertenecen a las más comunes que son virtualmente encontradas en todas las células. Estas enzimas catalizan las reacciones de las rutas metabólicas centrales, necesarias para mantener la vida.

La mayor parte de las reacciones catalizadas por enzimas no procederían a velocidades apreciables bajo condiciones fisiológicas en ausencia de las enzimas. El papel principal de las enzimas es aumentar las velocidades de tales reacciones. En forma típica, las reacciones catalizadas por las enzimas son de 10^3 a 10^{20} veces más rápidas que las mismas sin catalizar.

Un catalizador es una sustancia que acelera la llegada a un equilibrio. Un catalizador puede cambiar en forma temporal durante la reacción, pero no cambia en el proceso general, porque se recicla para participar en varias reacciones. Los reactivos se unen a un catalizador y los productos se disocian de él. Un catalizador no cambia la posición del equilibrio de la reacción (es decir, no hace que una reacción no favorable sea favorable). Más bien reduce la cantidad de energía necesaria para que se efectúe la reacción. Los catalizadores aceleran las reacciones tanto hacia adelante como hacia atrás al convertir un proceso de uno o dos pasos en varios pasos menores, cada uno con menor necesidad de energía que la reacción no catalizada. El capítulo siguiente describe los detalles de la forma en que las enzimas actúan como catalizadores.

Las enzimas son muy específicas para los reactivos o **sustratos** sobre los que actúan, y varía el grado de especificidad hacia el sustrato. Algunas enzimas actúan sobre un gru-

Arriba: La enzima acetilcolinesterasa, con el inhibidor reversible clorhidrato de donepecilo (Aricept, se muestra en rojo) ocupando el sitio activo. Se usa Aricept para mejorar las funciones mentales en pacientes con enfermedad de Alzheimer. Se cree que actúa inhibiendo la descomposición del neurotransmisor acetilcolina en el cerebro, prolongando así los efectos del neurotransmisor. (Sin embargo, no afecta el curso de la enfermedad). [PDB 1EVE]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

po de sustratos relacionados y otras sólo sobre un simple compuesto. Muchas enzimas poseen **estereoespecificidad** ya que sólo actúan sobre un estereoisómero del sustrato. Quizá el aspecto más importante de la especificidad de una enzima es la **especificidad de reacción**, esto es, la falta de formación de subproductos como desperdicios. La especificidad de reacción se refleja en la pureza excepcional del producto (100% en esencia) —mucho mayor que la pureza de productos de reacciones típicas catalizadas en química orgánica. La especificidad de las enzimas no sólo ahorra energía a las células sino que también evita la formación de productos metabólicos potencialmente tóxicos.

Las enzimas pueden hacer más que sólo aumentar la velocidad de una sola reacción muy específica. Algunas también pueden combinar, o acoplar, dos reacciones que normalmente serían separadas. Esta propiedad permite que la energía ganada en una reacción se use en una segunda reacción. Las **reacciones acopladas** son una propiedad común de muchas enzimas; por ejemplo, la hidrólisis del ATP se acopla con frecuencia a reacciones metabólicas menos favorables.

Algunas reacciones enzimáticas funcionan como puntos de control en el metabolismo. Como se podrá apreciar, el metabolismo se regula en una variedad de formas, que incluyen alteraciones en las concentraciones de enzimas, sustratos e inhibidores de enzima, así como la modulación de los niveles de actividad de ciertas enzimas. Las enzimas cuya actividad es regulada, tienen en general, una estructura más compleja que las enzimas no reguladas. Con pocas excepciones, las enzimas reguladas son moléculas oligoméricas que tienen sitios de enlace separados para sustratos y moduladores, compuestos que actúan como señales de regulación. El hecho de que la actividad enzimática pueda ser regulada es una propiedad importante que distingue a los catalizadores biológicos de los que se encuentran en un laboratorio de química.

El nombre *enzima* deriva de una palabra griega que significa “en la levadura”. Indica que dichos catalizadores están presentes en el interior de las células. A finales del siglo XIX se estudió la fermentación de los azúcares por acción de células de levadura. Los vitalistas (que sostenían que los compuestos orgánicos sólo podían ser formados por células vivas) afirmaban que se necesitaban células intactas para la fermentación. Los mecanicistas decían que las enzimas en las células de levadura eran las que catalizaban las reacciones de fermentación. Esta última conclusión fue respaldada por la observación de que los extractos de levadura, sin contenido de células, pueden catalizar la fermentación. A este hallazgo pronto siguió la identificación de las reacciones individuales y de las enzimas que las catalizan.

Una generación después, James B. Summer cristalizó, en 1926, la primera enzima (ureasa) y demostró que era una proteína. En la siguiente década se purificaron cinco enzimas más y se encontró que también eran proteínas: pepsina, tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasa y la enzima Old Yellow (una flavoproteína NADPH oxidasa). Desde entonces se ha demostrado que casi todas las enzimas son proteínas, o proteínas más cofactores. Algunas moléculas de ARN también presentan actividad catalítica, pero usualmente no se les llama enzimas.

Las moléculas de ARN catalítico se describen en los capítulos 21 y 22.

En este capítulo se describe a las enzimas y sus propiedades, comenzando con su clasificación y nomenclatura. Después se tratará el análisis cinético (mediciones de velocidades de reacción) destacando la forma en que los experimentos cinéticos pueden revelar las propiedades de una enzima y la naturaleza de los complejos que forma con los sustratos y los inhibidores. Por último, se describen los principios de inhibición y activación de enzimas reguladoras. En el capítulo 6 se explica la forma en que trabajan las enzimas a nivel químico y para ilustrar la relación entre la estructura de la proteína y la función enzimática el uso de serina proteasas. El capítulo 7 se dedica a la bioquímica de las coenzimas, moléculas orgánicas que ayudan a algunas enzimas en su papel catalítico al proporcionar grupos reactivos que no se encuentran en las cadenas laterales de aminoácidos. En los capítulos restantes se presentan muchos otros ejemplos de las cuatro propiedades principales de las enzimas: 1) pueden desempeñarse como catalizadores, 2) catalizan reacciones muy específicas, 3) pueden acoplar reacciones y 4) su actividad puede ser regulada.

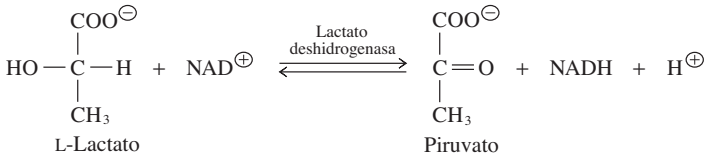
5.1 Las seis clases de enzimas

Los nombres en la mayor parte de las enzimas metabólicas se forman agregando el sufijo —*asa* al nombre de sus sustratos, o a un término descriptivo de la reacción que catalizan. Por ejemplo, la ureasa tiene a la urea como sustrato. La alcohol deshidrogenasa

cataliza la remoción de hidrógeno de los alcoholes (es decir, la oxidación de alcoholes). Unas pocas enzimas, como la tripsina y la amilasa, se conocen por sus nombres históricos. Muchas enzimas recién descubiertas reciben su nombre de acuerdo con sus genes o de alguna característica no descriptiva. Por ejemplo, el nombre de Rec A se debe al gen *rec*A y el de HSP70 es de una proteína de choque producida por calor; ambas enzimas catalizan la hidrólisis del ATP.

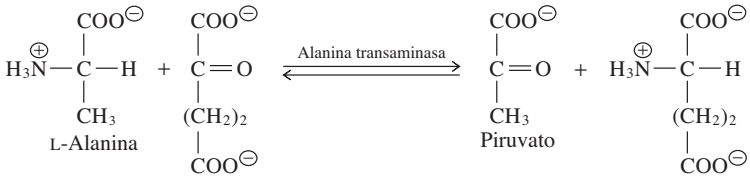
Un comité de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB, de *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) mantiene un esquema de clasificación que asigna categorías a las enzimas de acuerdo con la clase general de reacción química orgánica que es catalizada. Las seis categorías son: oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas; se definirán más adelante con un ejemplo para cada una. El esquema de clasificación de la IUBMB asigna un número único, llamado número de clasificación de la enzima, o número EC (de *enzyme classification*) para cada enzima. La IUBMB también asigna un nombre sistemático a cada enzima. El nombre sistemático puede ser distinto del nombre común de la enzima. En este libro, usualmente se referirá a las enzimas por sus nombres comunes. La base de datos de la clasificación completa, se puede ver en **www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/.**

1. Las **oxidorreductasas** catalizan las reacciones de oxidación-reducción. La mayor parte de esas enzimas se llaman, en general, **deshidrogenasas**. También hay otras enzimas en esta clase que se llaman oxidasas, peroxidasas, oxigenasas o reductasas. En bioquímica hay cada vez más la tendencia a citar esas enzimas por su nombre formal, oxidorreductasas, y no por los nombres más comunes en las publicaciones no muy recientes de bioquímica. Un ejemplo de una oxidorreductasa es la lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.27), llamada también lactato:NAD oxidorreductasa. Esta enzima cataliza la conversión reversible de L-lactato en piruvato. La oxidación de L-lactato se acopla a la reducción de la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido ($NAD^{\oplus}$).



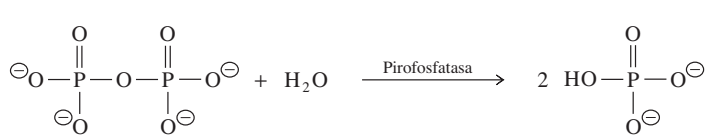
(5.1)

2. Las **transferasas** catalizan las reacciones de transferencia de un grupo y pueden necesitar la presencia de coenzimas. En las reacciones de transferencia de grupo, una parte de la molécula del sustrato se suele enlazar en forma covalente con la enzima o con su coenzima. Este grupo incluye las cinasas, enzimas que catalizan la transferencia de un grupo fosforilo del ATP. La alanina transaminasa, cuyo nombre sistemático es L-alanina:2-oxiglutarato aminotransferasa (EC 2.6.1.2), es un ejemplo típico de esta clase.

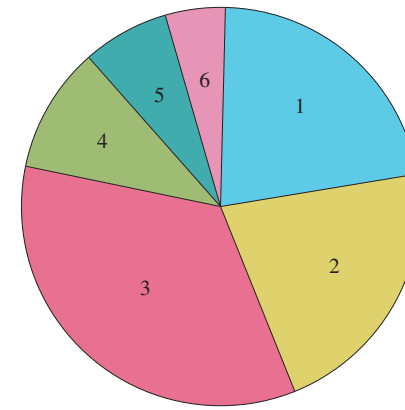


(5.2)

3. Las **hidrolasas** catalizan hidrólisis. Son una clase especial de transferasas donde el agua sirve como aceptor del grupo transferido. La pirofosfatasa es un ejemplo sencillo de una hidrolasa. El nombre sistemático de esta enzima es difosfato fosfohidrolasa (EC 3.6.1.1).

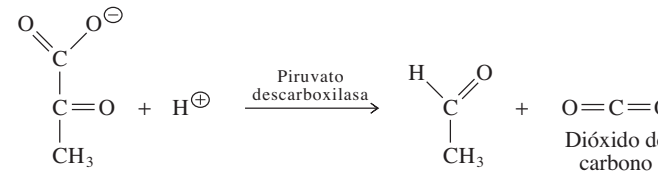


(5.3)



▲ Distribución de todas las enzimas conocidas por número de clasificación EC. 1: oxidorreductasas, 2: transferasas, 3: hidrolasas, 4: liasas, 5: isomerasas, 6: ligasas.

4. Las **liasas** catalizan la lisis de un sustrato, al generar un enlace doble; son reacciones de eliminación, no hidrolíticas y no oxidantes. En dirección inversa, las liasas catalizan la adición de un sustrato a un doble enlace de un segundo sustrato. Una liasa que cataliza una reacción de adición en las células es frecuentemente llamada **sintasa**. La piruvato descarboxilasa pertenece a esta clase de enzimas ya que descompone al piruvato en acetaldehído y dióxido de carbono. El nombre sistemático de la piruvato descarboxilasa, 2-oxo-ácido carboxi-liasa (EC 4.1.1.1.) casi nunca se emplea.

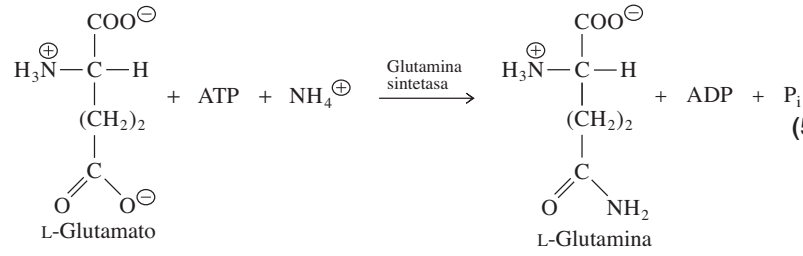


(5.4)

5. Las **Isomerasas** catalizan cambios estructurales dentro de una misma molécula (reacciones de isomerización). Como estas reacciones sólo tienen un sustrato y un producto son de las reacciones enzimáticas más simples. La alanina racemasa (EC 5.1.1.1) es una isomerasa que cataliza la interconversión de L-alanina y D-alanina. El nombre común es igual al nombre sistemático.

(5.5)

6. Las **ligasas** catalizan la ligadura o unión de dos sustratos. Estas reacciones necesitan un suministro de energía potencial química de un nucleósido trifosfato, como el ATP. Las ligasas son usualmente llamadas **sintetasas**. La glutamina sintetasa, o L-glutamato:amoniaco ligasa (formadora de ADP) (EC 6.3.12) usa la energía de la hidrólisis del ATP para unir glutamato y amoniaco para producir glutamina.



(5.6)

De los ejemplos anteriores, es posible ver que la mayor parte de las enzimas tienen más de un sustrato, aunque el segundo sustrato pueda ser sólo una molécula de agua. Nótese también que, aunque las enzimas catalizan las reacciones tanto directas como inversas, se usan flechas de una dirección cuando el equilibrio favorece un gran exceso de producto frente al sustrato. En el equilibrio, una enzima cataliza las reacciones directa e inversa con la misma velocidad.

5.2 Experimentos cinéticos revelan propiedades de las enzimas

El estudio de las propiedades de las enzimas se iniciará examinando las velocidades de reacciones catalizadas por las mismas. Tales estudios pertenecen a la categoría de cinética enzimática (del griego *kinhtikoj* = en movimiento). Éste es el lugar adecuado para co-

menzar con la propiedad más importante de las enzimas que es la de actuar como catalizadores, que aceleran las velocidades de las reacciones. La cinética enzimática proporciona una información indirecta acerca de especificidades y mecanismos catalíticos de las enzimas. Los experimentos cinéticos también revelan si una enzima está regulada.

Durante la primera mitad del siglo XX, la mayor parte de la investigación en enzimas se limitaba a experimentos cinéticos. Dichas investigaciones revelaron la forma en que las variaciones en las condiciones experimentales o los cambios en la concentración de enzima o sustrato afectan las velocidades de las reacciones. Antes de describir en detalle la cinética enzimática, se repasarán los principios de la cinética de sistemas químicos no enzimáticos. Estos principios se aplicarán entonces a las reacciones enzimáticas.

Recuerde que las concentraciones se representan con corchetes: [P] representa la concentración de producto, [E] la concentración de enzima y [S] la concentración del sustrato.

A. Cinética química

En los experimentos cinéticos se examina la relación entre la cantidad de **producto** (P) que se forma en una unidad de tiempo ($\Delta[P]/\Delta t$) y las condiciones experimentales bajo las que se efectúa la reacción. La base de la mayor parte de las mediciones cinéticas es la observación de la rapidez, o **velocidad** (v), de una reacción, la cual varía en forma directa con la concentración de cada reactante (sección 1.4). Esta observación se expresa en una **ecuación de velocidad**. Por ejemplo, la ecuación de velocidad para la conversión no enzimática del sustrato (S) en el producto (P) en una reacción de isomerización, es

$$\frac{\Delta[P]}{\Delta t} = v = k[S] \qquad \textbf{(5.7)}$$

La ecuación de velocidad refleja que la velocidad de una reacción depende de la concentración del sustrato ([S]). El símbolo k es la constante de velocidad e indica la velocidad o la eficiencia de una reacción. Cada reacción tiene una constante de velocidad diferente. Las unidades de la constante de velocidad para una reacción simple son s^{-1}.

Al avanzar una reacción, la cantidad de producto ([P]) aumenta y la cantidad de sustrato ([S]) disminuye. En la figura 5.1a se ve un ejemplo del avance de varias reacciones. La velocidad es la pendiente de la curva durante determinado intervalo de tiempo. La forma de las curvas indica que la velocidad decrece respecto al tiempo, lo cual era de esperarse.

En este ejemplo hipotético, la velocidad de la reacción llega a ser cero al final, cuando se consume el sustrato. Eso explicaría por qué la curva se aplana cuando los tiempos son grandes. (Véase más adelante otra explicación). Es interesante conocer la relación entre la concentración del sustrato y la velocidad de una reacción ya que si se conocen estos dos valores será posible aplicar la ecuación 5.7 para calcular la constante de velocidad. La única concentración exacta de sustrato es la que se prepara al comenzar el experimento. Esta concentración cambia durante el experimento. La velocidad de la reacción en el inicio preciso de la reacción es el valor que se desea conocer. Este valor representa la velocidad de la reacción a una concentración conocida del sustrato antes de que cambie.

La velocidad inicial (v_0) se puede determinar a partir de la pendiente del progreso de las curvas (figura 5.1a) o de las derivadas de esas curvas. En la figura 5.1b se ve una gráfica de velocidad inicial en función de la concentración de sustrato que es una línea recta. La pendiente de la curva en la figura 5.1b es la constante de velocidad.

Una mejor descripción de esta reacción sencilla sería

$$S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} P \qquad \textbf{(5.8)}$$

El experimento que muestra la figura 5.1 sólo determina la constante de velocidad directa (en dirección de avance) ya que se reunieron los datos bajo condiciones en las que no había reacción inversa. Ésta es otra razón importante para calcular la velocidad inicial (v_0) y no la velocidad en algún momento posterior. En una reacción reversible, el aplanamiento del progreso de las curvas no representa la velocidad cero. Sólo indica que no hay aumento neto del producto al paso del tiempo porque la reacción ha llegado al equilibrio.

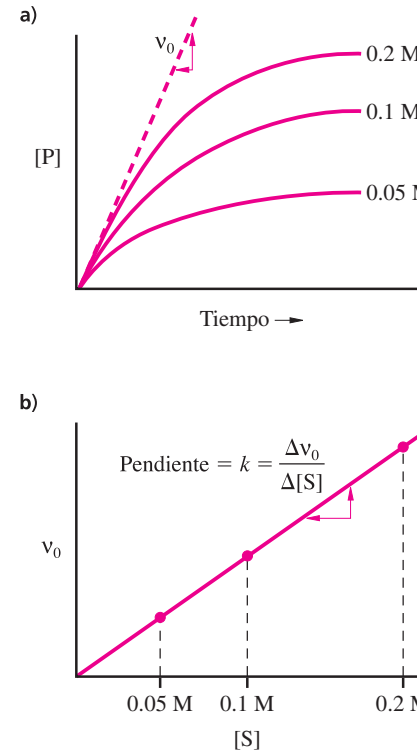


Figura 5.1 ▲
Velocidad de una reacción química simple. **a)** Se grafica la cantidad de producto elaborado durante cierto tiempo para diversas concentraciones iniciales de sustrato. La velocidad inicial, v_0, es la pendiente del progreso de la curva al iniciar la reacción. **b)** La velocidad inicial en función de la concentración inicial del sustrato. La pendiente de la curva es la constante de velocidad.

En una reacción más complicada que de un sólo paso, como la reacción $S_1 + S_2 \rightarrow P_1 + P_2$, la velocidad es determinada por las concentraciones de ambos sustratos. Si están presentes ambos sustratos a concentraciones similares, la ecuación de velocidad es

$$v = k[S_1][S_2] \qquad \textbf{(5.9)}$$

La constante de velocidad para reacciones donde intervienen dos sustratos tiene las unidades $M^{-1}s^{-1}$. Estas constantes de velocidad se pueden determinar estableciendo condiciones en las que la concentración de un sustrato es muy alta y la otra se hace variar. La velocidad de la reacción sólo depende, en este caso, de la concentración del sustrato limitante de la velocidad.

B. Cinética enzimática

Uno de los primeros y grandes avances en bioquímica, fue el descubrimiento de que las enzimas se unen en forma transitoria a los sustratos, resultado de la investigación de la cinética enzimática. Emil Fischer, en 1894, propuso que una enzima presenta una plantilla rígida, o cerradura, y que el sustrato es la llave que le corresponde. Sólo los sustratos específicos se pueden ajustar a determinada enzima. Los primeros estudios de cinética enzimática confirmaron que una enzima (E) se une a un sustrato para formar un **complejo enzima-sustrato** (ES). Los complejos ES se forman cuando los ligandos se unen de manera no covalente a sus lugares adecuados en el sitio activo. El sustrato reacciona en forma transitoria con la proteína catalizadora (y con otros sustratos, en una reacción multisustratos) para formar el producto de la reacción.

Imagínese ahora una reacción enzimática simple, la conversión de un sustrato en un producto catalizada por una enzima. Aunque la mayor parte de las reacciones enzimáticas tiene dos o más sustratos, se pueden describir los principios generales de la cinética enzimática suponiendo el caso sencillo en que hay un sustrato y un producto.

$$E + S \longrightarrow ES \longrightarrow E + P \qquad \textbf{(5.10)}$$

Esta reacción se efectúa en dos pasos distintos: la formación del complejo enzima-sustrato y la reacción química actual, acompañada por la disociación del producto. Cada paso transcurre con una velocidad característica. La velocidad total de una reacción enzimática depende de las concentraciones tanto del sustrato como del catalizador (la enzima). Cuando la cantidad de enzima es mucho menor que la cantidad de sustrato, la reacción depende de la cantidad de enzima.

La línea recta de la figura 5.2 ilustra el efecto de la concentración de la enzima sobre la velocidad de reacción, en una reacción de seudoprimer orden. Estas condiciones se usan en cuantificaciones de enzima donde se determinan concentraciones de éstas. La concentración de una enzima en una muestra se puede determinar con facilidad comparando su actividad con una curva de referencia parecida a la curva modelo de la figura 5.2. Bajo estas condiciones experimentales hay cantidades suficientes de moléculas de sustrato para que cada molécula de enzima se una a una molécula de sustrato y forme un complejo ES; a esta condición se le llama **saturación** de la E con el S. Los análisis de enzima miden la cantidad de producto formado en determinado tiempo. En algunos métodos de análisis se puede usar un espectrofotómetro para registrar y obtener continuamente los datos; en otros métodos las muestras se extraen y analizan a intervalos. La cuantificación se hace a pH y temperatura constantes, que se suelen escoger para obtener una actividad enzimática óptima, o para aproximarse a las condiciones fisiológicas.

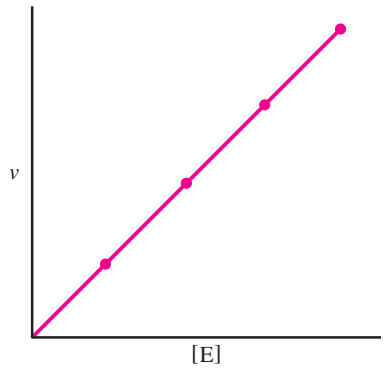


Figura 5.2 ▲
Efecto de la concentración de enzima ([E]) sobre la velocidad inicial (v_0) de una reacción catalizada por enzima a una [S] fija de saturación. La velocidad de reacción está influida por la concentración de la enzima, pero no por la concentración de otro reactante, S.

Si se comienza una reacción catalizada por una enzima mezclando sustrato y enzima, no hay producto presente durante las primeras etapas de la reacción. Bajo estas condiciones se puede ignorar la reacción inversa, donde P se combina con E y se convierte en S. Entonces, la reacción se puede describir con

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P \qquad \textbf{(5.11)}$$

Las constantes de velocidad k_1 y k_{-1} en la reacción 5.11 gobiernan las velocidades de asociación de S con E y de disociación de S a partir de ES, respectivamente. Este primer

paso es un equilibrio de interacción de enlace parecido a la unión del oxígeno con la hemoglobina. La constante de velocidad para el segundo paso es k_2, la velocidad de formación del producto a partir de ES. Nótese que la conversión del complejo ES en enzima libre y producto se indica con una flecha de una dirección porque la velocidad de la reacción inversa (E + P → EP) es insignificante. La velocidad, medida durante este corto periodo es la **velocidad inicial** (v_0), que fue descrita en la sección anterior. La formación y disociación de los complejos ES son reacciones que suelen ser muy rápidas ya que sólo se forman y se rompen enlaces no covalentes. En contraste, la conversión de sustrato en producto suele ser la velocidad limitante. Es durante este paso cuando se produce la alteración química del sustrato.

La cinética enzimática se diferencia de la cinética química simple porque las velocidades de reacciones catalizadas por enzimas dependen de la concentración de la enzima y ésta nunca es un producto ni un sustrato de la reacción. Las velocidades también difieren porque el sustrato debe unirse a la enzima para poder convertirse en el producto.

En una reacción catalizada por enzima, las velocidades iniciales se obtienen del progreso de las curvas, igual que en las reacciones químicas. La figura 5.3 muestra el progreso de las curvas a dos concentraciones distintas de la enzima en presencia de una alta concentración inicial de sustrato ([S] >> [E]). En este caso, la velocidad de formación del producto depende de la concentración de la enzima y no de la concentración del sustrato. Los datos de experimentos como los de la figura 5.3 se pueden usar para graficar la curva de la figura 5.2.

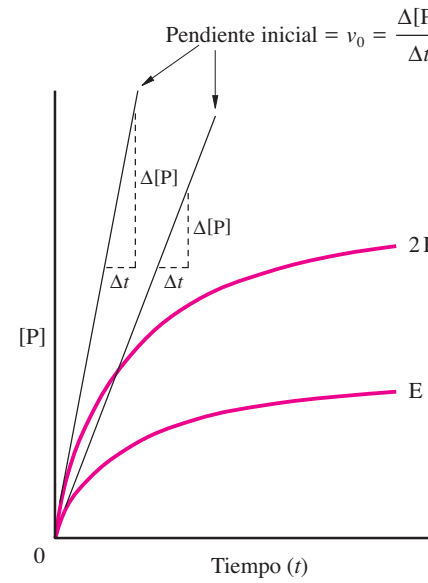


Figura 5.3 ▲
Curva de avance de una reacción catalizada por enzima. [P] es la concentración de producto y aumenta a medida que avanza la reacción. La velocidad inicial de la reacción, v_0, es la pendiente de la parte lineal inicial de la curva. Nótese que la velocidad de reacción se incrementa al doble cuando se agrega el doble de enzima (2 E, curva superior) a una mezcla de reacción que, por lo demás, es idéntica.

5.3 Ecuación de Michaelis-Menten

Las reacciones catalizadas por enzimas, como cualquier reacción química, se pueden describir en forma matemática como ecuaciones de velocidad. En ellas, varias constantes indican la eficiencia y especificidad de una enzima y en consecuencia son útiles para comparar las actividades de varias enzimas o para evaluar la importancia fisiológica de una determinada enzima. Las primeras ecuaciones de velocidad fueron deducidas a principios de 1900 examinando los efectos de variaciones en la concentración de sustrato. La figura 5.4a en la página siguiente muestra un resultado típico, donde la velocidad inicial (v_0) de una reacción es graficada en función de la concentración de sustrato ([S]).

Los datos se pueden explicar con la reacción presentada en la ecuación 5.11. El primer paso es una interacción bimolecular entre la enzima y el sustrato para formar un complejo ES. A altas concentraciones de sustrato (parte derecha de la curva de la figura 5.4) la velocidad inicial no cambia mucho cuando se agrega más S. Ello indica que la cantidad de enzima ha llegado a ser limitante de la velocidad de esta reacción. La concentración de la enzima es una parte importante de la reacción general, como es de esperarse para la formación de un complejo ES. A bajas concentraciones de sustrato (parte izquierda de la curva de la figura 5.4), la velocidad inicial es muy sensible a cambios de concentración de sustrato. Bajo esas condiciones, la mayor parte de las moléculas de enzima todavía no se han unido al sustrato y la formación del complejo ES depende de la concentración de sustrato.

La pendiente de la curva de v_0 en función de [S] es la de una hipérbola rectangular. Las curvas hiperbólicas son indicativas de procesos donde hay una disociación simple, como se pudo apreciar en la disociación del oxígeno desde la oximioglobina (sección 4.13B). Esta es una evidencia más de que la reacción sencilla que se estudió es bimolecular, implicando la asociación de E y S para formar un complejo ES.

La ecuación de una hipérbola rectangular es

$$y = \frac{ax}{b + x} \qquad \textbf{(5.12)}$$

donde a es la asíntota de la curva (el valor de y a un valor de x infinito) y b es el punto del eje x que corresponde a un valor igual a $a/2$. En los experimentos de cinética enzimática, $y = v_0$ y $x = [S]$. El valor asintótico (a) se llama $V_{máx}$. Es la velocidad máxima de la reacción a concentraciones de sustrato infinitamente grandes. Con frecuencia se indica el valor de $V_{máx}$ en las gráficas de v_0 contra [S], pero no es obvio por qué se escogió

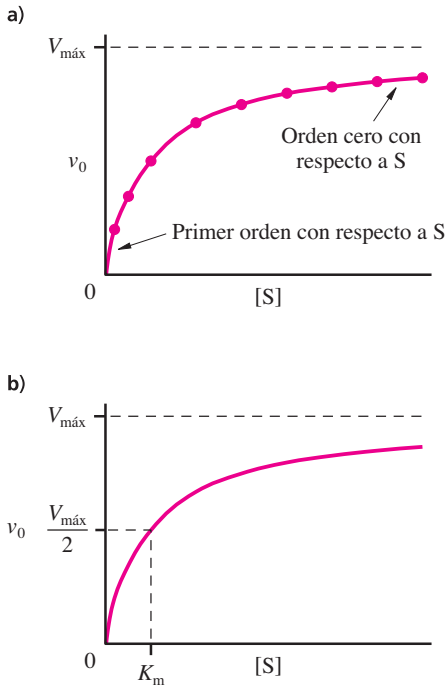


Figura 5.4 ▲
Gráficas de velocidad inicial v_0 en función de la concentración de sustrato ([S]) para una reacción catalizada por enzima. **a)** Cada punto del experimento se obtiene de una curva separada usando la misma concentración de enzima. La forma de la curva es hiperbólica. A bajas concentraciones de sustrato, la curva tiende a una recta que asciende con mucha pendiente. En esta región de la curva, la reacción depende mucho de la concentración de sustrato. A altas concentraciones de sustrato, la enzima está casi saturada y la velocidad inicial de la reacción no cambia mucho cuando se aumenta más la concentración del sustrato. **b)** La concentración del sustrato que corresponde a la mitad de la velocidad máxima se llama constante de Michaelis (K_m). La enzima está a la mitad de la saturación cuando S = K_m.

esta asíntota en particular. Una de las características de las curvas hiperbólicas es que parecen aplanarse a concentraciones moderadas de sustrato, a un valor que parece ser mucho menor que la $V_{máx}$. La $V_{máx}$ real no se determina tratando de estimar la posición de la asíntota a partir de la forma de la curva. Más bien se determina en forma precisa y correcta ajustando los datos a la ecuación general de una hipérbola rectangular.

El término *b* en la ecuación general de una hipérbola rectangular se llama **constante de Michaelis** (K_m), y se define como la concentración de sustrato cuando v_0 es igual a la mitad de la $V_{máx}$ (figura 5.4b). La ecuación completa de velocidad es

$$v_0 = \frac{V_{máx}[S]}{K_m + [S]} \qquad \textbf{(5.13)}$$

Esta es llamada la **ecuación de Michaelis-Menten**, por Leonor Michaelis y Maud Menten. Nótese cómo la forma general de la ecuación se compara con la ecuación 5.12. La ecuación de Michaelis-Menten describe la relación entre la velocidad inicial de una reacción y la concentración del sustrato. En la sección que sigue se deducirá la ecuación de Michaelis-Menten por un método cinético para después examinar el significado de las diversas constantes.

A. Deducción de la ecuación de Michaelis-Menten

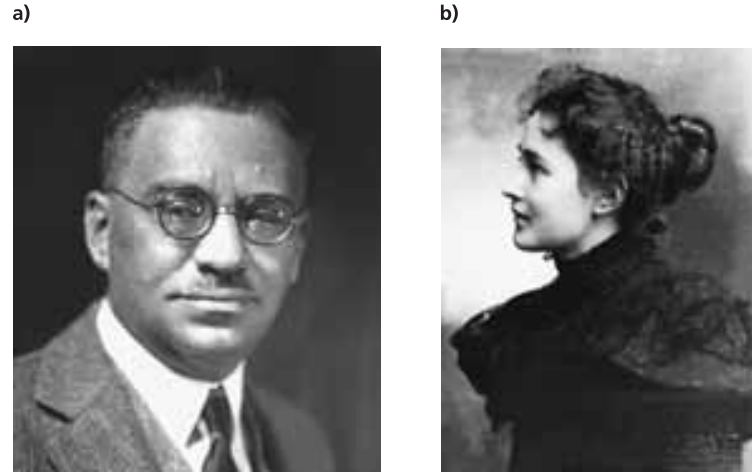
Una deducción común de la ecuación de Michaelis-Menten, debida a George E. Briggs y J. B. S. Haldane, es llamada la derivación del estado estable. Esta deducción postula que hay un intervalo de tiempo (llamado estado estable, o estado estacionario) durante el cual se forma el complejo ES a la misma velocidad con la que se descompone, de modo que la concentración de ES es constante. La velocidad inicial se usa en la derivación del estado estable porque se asume que la concentración de producto ([P]) es insignificante. Tal estado estable es una condición común para las reacciones metabólicas en las células.

Al suponer que la concentración de ES en estado estable es constante, entonces la velocidad de formación de producto depende de la velocidad de la reacción química y de la velocidad de disociación de P para abandonar la enzima. El paso limitante de la velocidad es hacia el lado derecho de la reacción 5.11 y la velocidad depende de la constante de velocidad k_2 y de la concentración de ES.

$$ES \xrightarrow{k_2} E + P \qquad v_0 = k_2[ES] \qquad \textbf{(5.14)}$$

La derivación del estado estable resuelve la ecuación 5.14 para [ES], usando términos que se pueden medir, como la constante de velocidad, la concentración total de la enzima ($[E]_{total}$) y la concentración de sustrato ([S]). Se supone que [S] es mayor que $[E]_{total}$,

▶ **a)** Maud Menten (1879-1960) y **b)** Leonor Michaelis (1875-1949), precursores en la cinética enzimática.



pero no necesariamente es saturada. Por ejemplo, rápidamente después de que se mezcla una cantidad pequeña de enzima con sustrato, [ES] se vuelve constante ya que la velocidad total de descomposición de ES (la suma de las velocidades de conversión de ES en E + S y en E + P) es igual a la velocidad de formación del complejo ES a partir de E + S. La velocidad de formación de ES a partir de E + S depende de la concentración de la enzima libre (moléculas de enzima que no están en la forma de ES), que es $[E]_{total} - [ES]$. La concentración del complejo ES permanece constante hasta el consumo del S, causado por el acercamiento de [S] a $[E]_{total}$. Se puede expresar lo anterior en una ecuación matemática:

$$\text{Velocidad de formación de ES} = \text{Velocidad de descomposición de ES}$$

$$k_1([E]_{total} - [ES])[S] = (k_{-1} + k_2)[ES] \qquad \textbf{(5.15)}$$

Se reordena la ecuación 5.15 para reunir las constantes de velocidad.

$$\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_m = \frac{([E]_{total} - [ES])[S]}{[ES]} \qquad \textbf{(5.16)}$$

La relación de las constantes de velocidad en el lado izquierdo de la ecuación 5.16 es la constante de Michaelis, K_m. A continuación, de esta ecuación se despeja [ES] en varios pasos.

$$[ES]K_m = ([E]_{total} - [ES])[S] \qquad \textbf{(5.17)}$$

Esto se desarrolla:

$$[ES]K_m = ([E]_{total}[S]) - ([ES][S]) \qquad \textbf{(5.18)}$$

Se reúnen los términos [ES],

$$[ES](K_m + [S]) = [E]_{total}[S] \qquad \textbf{(5.19)}$$

y

$$[ES] = \frac{[E]_{total}[S]}{K_m + [S]} \qquad \textbf{(5.20)}$$

La ecuación 5.20 describe la concentración de ES en el estado estable mediante términos que se pueden medir en un experimento. Si se sustituye el valor de [ES] en la ecuación de velocidad (ecuación 5.14), el resultado es

$$v_0 = k_2[ES] = \frac{k_2[E]_{total}[S]}{K_m + [S]} \qquad \textbf{(5.21)}$$

Como se indica en la figura 5.4a, cuando la concentración de S es muy alta, la enzima está saturada y esencialmente, todas las moléculas de E están presentes como ES. Si se agrega más S casi no hay efectos sobre la velocidad de reacción. La única forma de aumentar esa velocidad es sí se agrega más enzima. Bajo esas condiciones, la velocidad es la máxima velocidad ($V_{máx}$), y esta velocidad se calcula con la concentración total de la enzima y la constante de velocidad k_2. Así,

$$V_{máx} = k_2[E]_{total} \qquad \textbf{(5.22)}$$

por definición. Esto se sustituye en la ecuación 5.21 y se llega a la forma más familiar de la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v_0 = \frac{V_{máx}[S]}{K_m + [S]} \qquad \textbf{(5.23)}$$

Ya se explicó que esta forma de la ecuación de Michaelis-Menten describe adecuadamente los datos de experimentos cinéticos. En esta sección se demostró que se puede

deducir la misma ecuación a partir de una consideración teórica de las implicaciones de la reacción 5.11, la ecuación para una reacción catalizada por enzima. La concordancia entre la teoría y los datos brinda la confianza de que las bases teóricas de la cinética enzimática están bien fundamentadas.

B. Constante catalítica k_{cat}

Cuando la concentración de sustrato es alta, la velocidad total de la reacción es $V_{máx}$ y está determinada por la concentración de la enzima. La constante de velocidad observada bajo estas condiciones se llama **constante catalítica**, K_{cat}, y se define como sigue:

$$V_{máx} = k_{cat}[E]_{total} \qquad k_{cat} = \frac{V_{máx}}{[E]_{total}} \tag{5.24}$$

donde k_{cat} representa la cantidad de moles de sustrato convertidos en producto, por segundo y por mol de enzima (o por mol de sitio activo, para una enzima con multisubunidades) bajo condiciones de saturación. En otras palabras, k_{cat} indica la cantidad máxima de moléculas de sustrato convertidas en producto cada segundo por cada sitio activo. A eso se le llama con frecuencia **número de recambio**. La constante catalítica mide la rapidez con que determinada enzima puede catalizar una reacción específica; es una forma muy útil para describir la eficacia de una enzima. La unidad de k_{cat} es s^{-1}. El recíproco de k_{cat} es el tiempo necesario para que haya un evento catalítico. Nótese que para obtener k_{cat} se debe conocer la concentración de la enzima.

Para una reacción sencilla, como la 5.11, el paso limitante es ES → E + P y $k_{cat} = k_2$. Muchas reacciones enzimáticas son más complejas. Si hay un paso que claramente sea limitante de la velocidad, su constante de velocidad es la k_{cat} de esa reacción. Si el mecanismo es más complejo, entonces k_{cat} puede ser una combinación de varias y distintas constantes de velocidad. Es la causa por la que se necesita una constante de velocidad diferente, k_{cat}, para describir la velocidad total de la reacción catalizada por enzimas. En la mayor parte de los casos se puede suponer que k_{cat} es una buena aproximación a k_2.

En la tabla 5.1 se muestran valores representativos de k_{cat}. La mayor parte de las enzimas son catalizadores potentes con valores de k_{cat} de 10^2 a 10^3 s^{-1}. Algunas enzimas son catalizadores extremadamente rápidos con valores de k_{cat} de 10^6 s^{-1} o mayores. Por ejemplo, la anhidrasa carbónica de mamíferos debe actuar con mucha rapidez para mantener el equilibrio entre CO_2 acuoso y el bicarbonato (sección 2.10). Como se verá en la sección 6.4B, la superóxido dismutasa y la catalasa son responsables de la rápida descomposición de los metabolitos tóxicos de oxígeno, el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, respectivamente. Las enzimas que catalizan un millón de reacciones por segundo suelen actuar sobre moléculas pequeñas de sustrato que se difunden con rapidez dentro de la célula.

TABLA 5.1 Ejemplos de constantes catalíticas

Enzima	$k_{cat}(s^{-1})$*
Papaína	10
Ribonucleasa	10^2
Carboxipeptidasa	10^2
Tripsina	10^2 (to 10^3)
Acetilcolinesterasa	10^3
Cinasas	10^3
Deshidrogenasas	10^3
Transaminasas	10^3
Anhidrasa carbónica	10^6
Superóxido dismutasa	10^6
Catalasa	10^7

* Las constantes catalíticas sólo se presentan como órdenes de magnitud.

C. Significados de K_m

La constante de Michaelis tiene varios significados. La ecuación 5.16 define a K_m como la relación de las constantes de velocidad combinadas para la descomposición de ES dividida entre la constante para su formación. Si la constante de velocidad para la formación de producto (k_2) es mucho menor que k_1 o que k_{-1}, como es el caso frecuente, se puede despreciar k_2 y K_m equivale a k_{-1}/k_1. En este caso, K_m es igual a la constante de equilibrio de disociación de ES para dar E + S. Así, K_m es una medida de la afinidad de E hacia S. Mientras menor sea el valor de K_m, el sustrato está más fuertemente unido. K_m también es uno de los parámetros que determina la forma de la curva de v_0 en función de [S] de la figura 5.4b. Es la concentración del sustrato cuando la velocidad inicial es la mitad del valor de $V_{máx}$. Este significado es consecuencia directa de la ecuación general de una hipérbola rectangular.

A veces se usan los valores de K_m para distinguir entre diferentes enzimas que catalizan la misma reacción. Por ejemplo, los mamíferos tienen distintas formas de lactato deshidrogenasa, cada una con valores distintos de K_m. Aunque es útil imaginar que K_m representa la constante de disociación en equilibrio de ES, para muchas enzimas K_m

es una función más compleja de las constantes de velocidad. Esto es especialmente importante cuando la reacción se efectúa en más de dos pasos.

5.4 Las constantes cinéticas indican la actividad enzimática y la eficiencia catalítica

Está demostrado que las constantes cinéticas k_m y k_{cat} se pueden usar para medir las actividades relativas de las enzimas y los sustratos. En la mayor parte de los casos, K_m es una medida de la estabilidad del complejo ES, y k_{cat} es similar a la constante de velocidad para la conversión de ES en E + P, y cuando el sustrato no es limitante (región A, figura 5.5). Recuérdese que k_{cat} es una medida de la actividad catalítica de una enzima e indica cuántas reacciones por segundo puede catalizar una molécula de enzima.

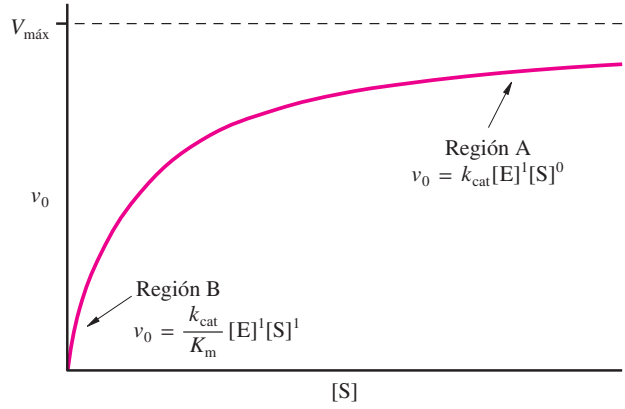
Al revisar la región B de la hipérbola en la figura 5.5. La concentración de S es muy baja y la curva se aproxima a una recta. Bajo estas condiciones, la velocidad de reacción depende de las concentraciones del sustrato y de la enzima. En términos químicos, es una reacción de segundo orden, y la velocidad depende de una constante de velocidad de segundo orden, que se define por

$$v_0 = k[E][S] \qquad \textbf{(5.25)}$$

Es interesante conocer cómo se determina esta constante de velocidad de segundo orden ya que indica la velocidad de la reacción catalizada por la enzima bajo condiciones fisiológicas. Cuando Michaelis y Menten escribieron toda la ecuación de velocidad por primera vez, usaron la forma que incluía a $k_{cat}[E]_{total}$ en vez de $V_{máx}$ (ecuación 5.24). Ahora que ya se comprende el significado de k_{cat} es posible sustituir $k_{cat}[E]_{total}$ en lugar de $V_{máx}$ en la ecuación de Michaelis-Menten (ecuación 5.23). Si se considera sólo la región de la curva de Michaelis-Menten donde la [S] es muy baja, esta ecuación se puede simplificar despreciando la [S] en el denominador ya que [S] es mucho menor que K_m.

$$v_0 = \frac{k_{cat}[E][S]}{K_m + [S]} = \frac{k_{cat}}{K_m}[E][S] \qquad \textbf{(5.26)}$$

Al comparar las ecuaciones 5.25 y 5.26 se comprueba que la constante de velocidad de segundo orden se aproxima mucho a k_{cat}/K_m. Así, la relación k_{cat}/K_m es una constante de velocidad aparente de segundo orden para la formación de E + P a partir de E + S



Región A: $ES \xrightarrow{k_{cat}} E + P$

Región B: $E + S \xrightarrow{\frac{k_{cat}}{K_m}} E + P$

$(E + S \longrightarrow ES \longrightarrow E + P)$

◀ Figura 5.5
Significados de k_{cat} y de k_{cat}/K_m. La constante catalítica (k_{cat}) es la constante de velocidad para la conversión del complejo ES a E + P, y se mide con más facilidad cuando la enzima está saturada con sustrato (región A de esta curva de Michaelis-Menten). La relación k_{cat}/k_m es la constante de velocidad para la conversión de E + S en E + P, a concentraciones muy bajas del sustrato (región B). Las reacciones medidas para estas constantes de velocidad se resumen bajo la gráfica.

TABLA 5.2 Eficiencias catalíticas de algunas enzimas

	Constante de velocidad no enzimática (k_n, en s^{-1})	Constante de velocidad enzimática (k_{cat}/K_m en $M^{-1}s^{-1}$)	Eficiencia catalítica
Anhidrasa carbónica	10^{-1}	7×10^{6}	7×10^{7}
Quimotripsina	4×10^{-9}	9×10^{7}	2×10^{16}
Corismato mutasa	10^{-5}	2×10^{6}	2×10^{11}
Triosa fosfato isomerasa	4×10^{-6}	4×10^{8}	10^{14}
Citidina desaminasa	10^{-10}	3×10^{6}	3×10^{16}
Adenosina desaminasa	2×10^{-10}	10^{7}	5×10^{16}
Mandelato racemasa	3×10^{-13}	10^{6}	3×10^{18}
β-Amilasa	7×10^{-14}	10^{7}	10^{20}
Fumarasa	10^{-13}	10^{9}	10^{21}
Arginina descarboxilasa	9×10^{-16}	10^{6}	10^{21}
Fosfatasa alcalina	10^{-15}	3×10^{7}	3×10^{22}
Orotidina 5′-fosfato descarboxilasa	3×10^{-16}	6×10^{7}	2×10^{23}

cuando la reacción total está limitada por encuentros de S con E. Esta relación tiende a ubicarse entre 10^8 y 10^9 $M^{-1}s^{-1}$, la máxima velocidad a la que dos solutos sin carga pueden aproximarse entre sí por difusión a la temperatura fisiológica. Las enzimas que pueden catalizar reacciones a esta velocidad tan grande se describirán en la sección 6.4.

La relación k_{cat}/K_m es útil para comparar las actividades de enzimas diferentes. También es posible evaluar la eficiencia de una enzima midiendo su **capacidad catalítica**. Este valor es igual a la constante de velocidad de una reacción en presencia de la enzima (k_{cat}/K_m) dividida entre la constante de velocidad de la misma reacción en ausencia de la enzima (k_n). Es de sorprender que sólo se conozcan pocos valores de eficiencia catalítica porque la mayor parte de las reacciones químicas se efectúa con lentitud extrema en ausencia de las enzimas —con tanta lentitud que sus velocidades sin enzima son muy difíciles de medir. Con frecuencia, las velocidades de reacción se miden en recipientes especiales de vidrio encerrados en acero a temperaturas mayores de 300°C.

La tabla 5.2 contiene una lista de varios ejemplos de eficiencias o capacidades catalíticas conocidas. Los valores típicos van de 10^{14} a 10^{20}, pero algunos son bastante mayores (hasta 10^{23}). La dificultad de obtener constantes de velocidad para reacciones no enzimáticas es confirmada por el tiempo medio de la reacción catalizada por la orotidina-5N-fosfato descarboxilasa que es de ¡unos 78 millones de años! Los valores de eficiencia catalítica de la tabla 5.2 remarcan una de las propiedades principales de las enzimas, su capacidad de aumentar las velocidades de reacciones que en el caso normal serían demasiado lentas para tener utilidad.

5.5 Medición de K_m y $V_{máx}$

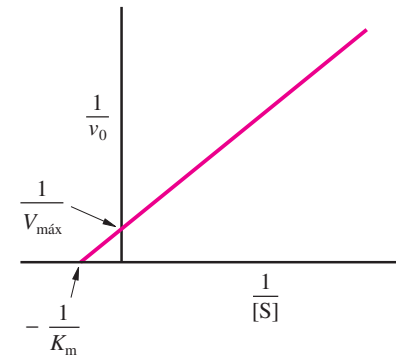
Los parámetros cinéticos de una reacción enzimática pueden producir información valiosa acerca de la especificidad y el mecanismo de la reacción. Los parámetros clave son K_m y $V_{máx}$ ya que k_{cat} se puede calcular si se conoce $V_{máx}$.

Los datos de K_m y $V_{máx}$ para una reacción catalizada por enzima se pueden determinar de diversas maneras. Es posible obtener ambos valores por análisis de las velocidades iniciales en una serie de concentraciones de sustrato y una concentración fija de enzima. Para obtener valores fiables de las constantes cinéticas, los puntos de [S] se deben extender por abajo y por arriba de K_m para producir una hipérbola. Es difícil determinar K_m o $V_{máx}$ en forma directa con una gráfica de velocidad inicial en función

de la concentración porque la curva tiende a la $V_{máx}$ en forma asintótica. Sin embargo, se pueden determinar valores exactos usando un programa de cómputo adecuado para ajustar los resultados experimentales a la ecuación de la hipérbola.

La ecuación de Michaelis-Menten se puede reacomodar para obtener valores de $V_{máx}$ y K_m a partir de líneas rectas en gráficas. La transformación de uso más frecuente es la gráfica de doble recíproco, o de Lineweaver-Burk, en la que se grafican los valores de $1/v_0$ contra los de 1/[S] (figura 5.6). El valor absoluto de $1/K_m$ se obtiene con la intersección de la recta con el eje x (es decir, la abscisa al origen), y el valor de $1/V_{máx}$ se obtiene con la ordenada al origen. Aunque las gráficas de doble recíproco no son los métodos más exactos para determinar las constantes cinéticas, se comprenden con facilidad y permiten contar con pautas reconocibles para estudiar la inhibición enzimática, un aspecto de extrema importancia en la enzimología que en breve se examinará.

Se pueden obtener valores de k_{cat} con mediciones de $V_{máx}$ sólo cuando se conoce la concentración absoluta de la enzima. Se pueden determinar los valores de K_m aun con enzimas que no hayan sido purificadas siempre y cuando sea una sola la enzima en la preparación impura la que pueda catalizar la reacción observada.



Ecuación de Lineweaver-Burk :

$$\frac{1}{v_0} = \left(\frac{K_m}{V_{máx}}\right)\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{máx}}$$

Figura 5.6 ▲
Gráfica de doble-recíproca (de Lineweaver-Burk). Esta gráfica se obtiene con una transformación lineal de la ecuación de Michaelis-Menten. Se grafican los valores de $1/v_0$ en función de los valores de 1/[S].

5.6 Cinética de las reacciones con sustratos múltiples

Las mediciones cinéticas de reacciones con sustratos múltiples (o *reacciones de multisustrato*) son algo más complicadas que para cinéticas enzimáticas sencillas con un solo sustrato. Sin embargo, para muchos fines, como por ejemplo el diseño de una cuantificación enzimática, basta sólo con determinar la K_m para cada sustrato en presencia de cantidades saturantes de cada uno de los demás sustratos, como fue descrito para las reacciones químicas (sección 5.2A). La cinética enzimática simple que se describe en este capítulo se puede ampliar para diferenciar entre varias posibilidades mecanísticas para reacciones multisustrato, como las reacciones de transferencia de grupo. Eso se hace midiendo el efecto de variaciones en la concentración de un sustrato en los resultados cinéticos obtenidos para el otro.

RECUADRO 5.1 Hipérbolas y rectas

Hemos visto que una gráfica de velocidad inicial de una reacción (v_0) en función de la concentración de sustrato ([S]) produce una curva hiperbólica, como las de las figuras 5.4 y 5.5. La ecuación general de una hipérbola rectangular (ecuación 5.12) y la ecuación de Michaelis-Menten tienen la misma forma (ecuación 5.13).

Es muy difícil determinar $V_{máx}$ a partir de una gráfica de datos cinéticos para la enzima porque la curva hiperbólica que describe la relación entre la concentración del sustrato y la velocidad inicial es asintótica hacia $V_{máx}$ y en forma experimental es difícil alcanzar la concentración de sustrato requerida para estimar $V_{máx}$. Por estas razones es más fácil con frecuencia convertir la curva hiperbólica en una forma lineal que se apegue a la fórmula general $y = mx + b$, donde "m" es la pendiente de la recta y "b" es la ordenada al origen. El primer paso para transformar la ecuación original de Michaelis-Menten en esta forma general de ecuación lineal es invertir los términos, para que los términos K_m + [S] queden arriba (en el numerador) del lado derecho. Eso se hace obteniendo el recíproco de ambos lados —transformación que podrá ser familiar a muchos que conozcan las curvas hiperbólicas.

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m + [S]}{V_{máx}[S]} \qquad \frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{máx}[S]} + \frac{[S]}{V_{máx}[S]} \qquad \frac{1}{v_0} = \left(\frac{K_m}{V_{máx}}\right)\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{máx}}$$

Los dos pasos siguientes consisten en separar términos y cancelar [S] en el segundo término del lado derecho de la ecuación. Esta forma de la ecuación de Michaelis-Menten se llama ecuación de Lineweaver-Burk y se parece a la forma general de una ecuación lineal, $y = mx + b$, donde y es el recíproco de v_0 y los valores de x son los recíprocos de [S]. A una gráfica de los datos en esta forma se le llama gráfica de doble recíproco. La pendiente de la línea será $K_m/V_{máx}$, y la ordenada al origen será $1/V_{máx}$.

La razón original de esta clase de transformación fue calcular $V_{máx}$ y K_m a partir de datos experimentales. Era más fácil graficar los valores recíprocos de v_0 y [S] y dibujar una recta que pase por los puntos para calcular las constantes cinéticas. Hoy hay programas de cómputo que pueden ajustar con exactitud los datos a una curva hiperbólica y calcular las constantes, por lo que ya no es necesaria la gráfica de Lineweaver-Burk para esta clase de análisis. En este libro seguiremos usando gráficas de Lineweaver-Burk para ilustrar algunas propiedades generales de cinéticas de enzimas, pero se usan rara vez para su propósito original de análisis de datos.

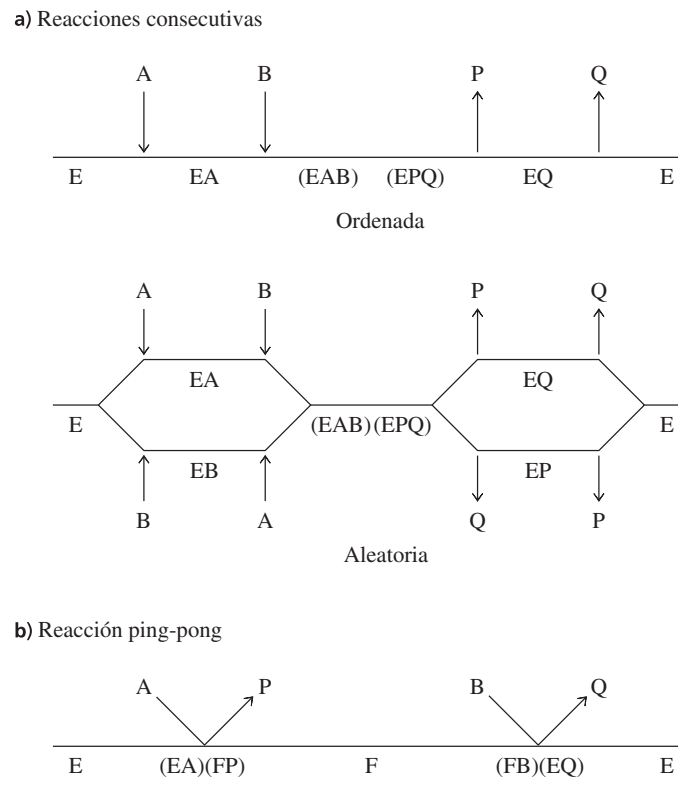


Figura 5.7 ▶
Notación para reacciones con bisustrato. **a)** En las reacciones consecutivas, todos los sustratos se enlazan antes de liberar un producto. La unión de los sustratos puede ser ordenada o aleatoria. **b)** En las reacciones ping-pong, un sustrato es enlazado y un producto es liberado dejando una enzima sustituida. Entonces se enlaza un segundo sustrato y se libera un segundo producto, con lo cual la enzima regresa a su forma original.

Las reacciones de multisustrato pueden efectuarse de acuerdo con varios y distintos esquemas cinéticos llamados mecanismos cinéticos porque se deducen en su totalidad mediante experimentos cinéticos. Los mecanismos cinéticos son comúnmente representados con la notación introducida por W. W. Cleland. Como se muestra en la figura 5.7, la secuencia de pasos va de izquierda a derecha. La adición de moléculas de sustrato (A, B, C, …) a la enzima y la liberación de productos (P, Q, R, …) desde la enzima se indican con flechas que apuntan hacia (unión de sustrato) o desde (liberación de producto) de la recta. Las diversas formas de la enzima (E libre, complejos ES o complejos EP) se escriben abajo de una línea horizontal. Los complejos ES que sufren transformación química cuando el sitio activo está lleno se muestran entre paréntesis. Las **reacciones consecutivas** (o **secuenciales**) (figura 5.7a) requieren que todos los sustratos estén presentes para que se libere algún producto. Estas reacciones secuenciales pueden ser **ordenadas**, con un orden obligatorio de enlazamiento de sustratos y de liberación de productos. También pueden ser **aleatorias**, sin orden obligatorio de enlazamiento o liberación. En las **reacciones ping-pong** (figura 5.7b), se libera un producto antes de que se enlacen todos los sustratos. En una reacción ping-pong de bisustrato, se enlaza el primer sustrato, se altera la enzima por sustitución y se libera el primer producto, después de lo cual se une el segundo sustrato, la enzima alterada regresa a su forma original y se libera el segundo producto. Debido al enlazamiento covalente de una porción de un sustrato a la enzima, a veces al mecanismo de ping-pong se le llama mecanismo de enzima sustituida. La unión y liberación de ligandos en un mecanismo de ping-pong se suelen indicar con líneas inclinadas. Las dos formas de la enzima se representan por E (no sustituida) y F (sustituida).

5.7 Inhibición reversible de enzimas

Un **inhibidor** de enzima (I) es un compuesto que se enlaza con una enzima e interfiere con su actividad. Los inhibidores pueden actuar evitando la formación del complejo ES

o bloqueando la reacción química que lleva a la formación del producto. Por regla general, los inhibidores son moléculas pequeñas que se unen en forma reversible con la enzima que inhiben. Las células contienen muchos inhibidores enzimáticos naturales que juegan papeles importantes en la regulación del metabolismo. Los inhibidores artificiales se usan en experimentos para investigar los mecanismos enzimáticos y para descifrar las rutas metabólicas. Algunas medicinas y muchos venenos son inhibidores de enzimas.

Los inhibidores irreversibles se describen en la sección 5.8.

Algunos inhibidores se unen en forma covalente con las enzimas y causando que la inhibición sea irreversible. La mayor parte de la inhibición de relevancia biológica es reversible. Los inhibidores reversibles se unen a las enzimas con las mismas fuerzas no covalentes que enlazan a sustratos y productos. Los inhibidores reversibles se diferencian de los irreversibles por su fácil eliminación de soluciones de enzima por métodos como diálisis o filtración en gel (sección 3.6). El equilibrio entre la enzima libre (E) más el inhibidor (I) y el complejo EI se caracteriza por una constante de disociación. En este caso, a la constante se le llama **constante de inhibición,** K_i.

$$E + I \rightleftharpoons EI \qquad K_d = K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} \tag{5.27}$$

Los tipos básicos de inhibición reversible son competitiva, acompetitiva y no competitiva. Se pueden diferenciar de manera experimental por sus efectos sobre el comportamiento cinético de las enzimas (tabla 5.3). La figura 5.8, en la página siguiente, muestra diagramas que representan los modos de inhibición enzimática reversible.

A. Inhibición competitiva

Los inhibidores competitivos son los que se encuentran con más frecuencia en bioquímica. En la inhibición competitiva, el inhibidor sólo se puede unir a moléculas de enzima libre que no estén unidas a sustrato alguno. La inhibición competitiva se ilustra con las figuras 5.8a y 5.8b, y por el esquema cinético de la figura 5.9a en la página 145. En este esquema sólo ES puede llevar a la formación de producto. La formación de un complejo EI quita a la enzima de su ruta normal.

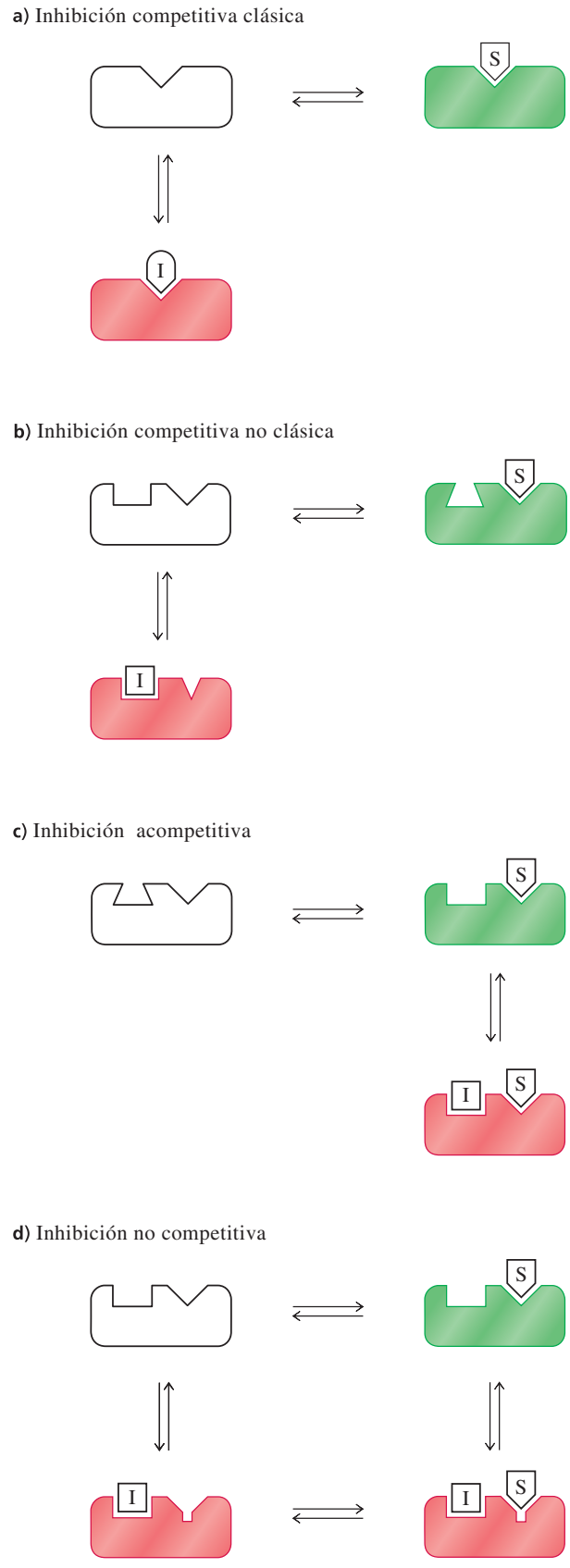
Cuando un inhibidor competitivo se une con una molécula de enzima, una molécula de sustrato no puede unirse a esa molécula de enzima. Al revés, la unión de sustrato y una molécula de enzima evita el enlazamiento de un inhibidor. En otras palabras, S e I compiten por unirse a la molécula de enzima. Más comúnmente, S e I se unen al mismo sitio de la enzima, el sitio activo. Este tipo de inhibición (figura 5.8a) se llama inhibición competitiva clásica. No es la única clase de inhibición competitiva. En algunos casos, como en las enzimas alostéricas (sección 5.10), el inhibidor se une a un sitio diferente, lo que altera el sitio de unión del sustrato y evita esta unión (figura 5.8b). A este tipo de inhibición se le llama inhibición competitiva no clásica. Cuando están presentes tanto I como S en una solución, la proporción de la enzima que puede formar complejos IS depende de las concentraciones de sustrato e inhibidor y de sus afinidades relativas hacia la enzima.

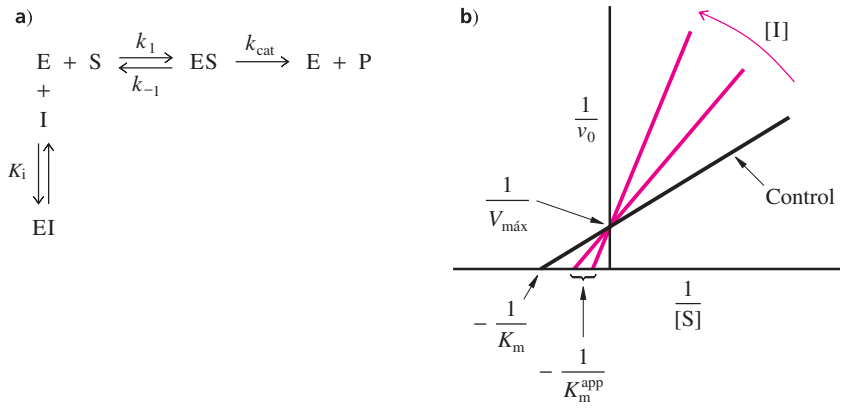
La cantidad de EI se puede reducir aumentando la concentración de S. A concentraciones suficientemente altas, la enzima puede estar saturada con sustrato.

TABLA 5.3 Efectos de inhibidores reversibles sobre constantes cinéticas

Tipo de inhibidor	Efecto
Competitivo (I sólo se une a E)	Aumenta K_m
	$V_{máx}$ permanece sin cambio
Acompetitivo (I sólo se une a ES)	$V_{máx}$ y K_m descienden
	No cambia la relación $V_{máx}/K_m$
No competitivo (I se une a E o a ES)	$V_{máx}$ desciende
	K_m permanece sin cambio

Figura 5.8 ▶
Diagramas de inhibición enzimática reversible. En este esquema, las enzimas catalíticamente competentes están en gris claro y las enzimas inactivas están en gris oscuro. **a)** Inhibición competitiva clásica. S e I se unen al sitio activo en una forma mutuamente excluyente. **b)** Inhibición competitiva no clásica. La unión de S con el sitio activo evita la unión de I a un sitio separado y viceversa. **c)** Inhibición acompetitiva. I se une sólo al complejo ES. La enzima se inactiva cuando se enlaza con I. **d)** Inhibición no competitiva. I se puede unir a E o a ES. La enzima se inactiva cuando se enlaza I. Aunque al complejo EI pueda unirse todavía S, no se forma producto.





◀ Figura 5.9
Inhibición competitiva. **a)** Esquema cinético para ilustrar el enlace de I con E. Nótese que es una ampliación de la ecuación 5.11, que incluye la formación del complejo EI. **b)** Gráfica de doble recíproco. En la inhibición competitiva, $V_{máx}$ permanece sin cambiar y K_m aumenta. La línea negra llamada "Control" es el resultado en ausencia de inhibidor. Las líneas grises son los resultados en presencia de inhibidor, y la flecha indica la dirección del aumento de la [I].

En consecuencia, la velocidad máxima es la misma en presencia o en ausencia de un inhibidor. Mientras más inhibidor competitivo esté presente, se necesitará más sustrato para llegar a la mitad de la saturación. Ha sido demostrado que la concentración de sustrato correspondiente a la mitad de saturación es la K_m. Así, en presencia de concentraciones crecientes de un inhibidor competitivo, aumenta la K_m. El nuevo valor se suele llamar K_m aparente (K_m^{app}). En una gráfica de doble recíproco, la adición de un inhibidor competitivo produce una disminución del valor absoluto de la abscisa al origen ($1/K_m$), mientras que la ordenada al origen ($1/V_{máx}$) permanece igual (figura 5.9b).

Muchos inhibidores competitivos clásicos son análogos al sustrato, compuestos que se parecen en su estructura a los sustratos. Los análogos se unen a la enzima, pero no reaccionan. Por ejemplo, la benzamidina es un inhibidor competitivo de la tripsina (figura 5.10). La tripsina cataliza la hidrólisis de los enlaces peptídicos cuyos grupos carbonilo contienen residuos de arginina y lisina, y la benzamidina es un análogo de la cadena lateral de alquilguanidilo en la arginina. La benzamidina actúa como inhibidor que compite con los residuos de arginina en péptidos por la unión de la tripsina.

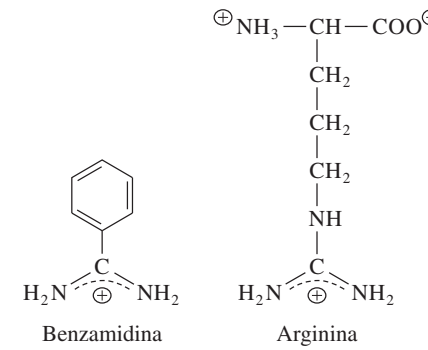
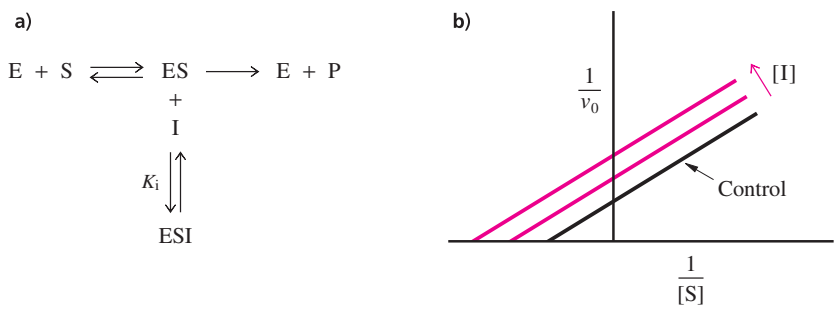


Figura 5.10 ▲
Benzamidina y arginina. La benzamidina compite con los residuos de arginina en la unión con la tripsina.

B. Inhibición acompetitiva

Los inhibidores acompetitivos sólo se unen al ES y no a la enzima libre (figuras 5.8c y 5.11a). En la inhibición acompetitiva disminuye la $V_{máx}$ (aumenta $1/V_{máx}$) por conversión de algunas moléculas de E en la forma inactiva ESI. Ya que es el complejo ES el que se enlaza con I y la disminución de $V_{máx}$ no se revierte por la adición de más sustrato. También, los inhibidores acompetitivos hacen descender la K_m (vista como un aumento del valor absoluto de $1/K_m$ en una gráfica de doble recíproco) ya que los equilibrios de formación de ES y de ESI son desplazados hacia los complejos, por la unión de I. Experimentalmente, las líneas de una gráfica de doble recíproco representando concentraciones variables de un inhibidor acompetitivo, tienen todas la misma pendiente, lo que indica que los valores de K_m y de $V_{máx}$ decrecieron proporcionalmente (figura 5.11b). Este tipo de inhibición suele presentarse en las reacciones de multisustrato.



◀ Figura 5.11
Inhibición acompetitiva. **a)** Esquema cinético que ilustra el enlace de I con ES. **b)** Gráfica de doble recíproco. En la inhibición acompetitiva decrecen tanto $V_{máx}$ como K_m (es decir, aumentan los valores absolutos de $1/V_{máx}$ y de $1/K_m$ obtenidos de las coordenadas x y y al origen, respectivamente). La relación $K_m/V_{máx}$ es la pendiente de las rectas y permanece sin cambio.

C. Inhibición no competitiva

Los inhibidores no competitivos se pueden unir a la E o al ES y formar complejos inactivos EI o ESI, respectivamente (figuras 5.8d y 5.12a). Esos inhibidores no son análogos del sustrato y no se enlazan en el mismo sitio que el S. El caso clásico de inhibición no competitiva se caracteriza por una disminución aparente de $V_{máx}$ ($1/V_{máx}$ parece aumentar) sin cambiar de la K_m. En una gráfica de doble recíproco, las líneas de la inhibición no competitiva clásica se cruzan en el punto del eje x que corresponde a $-1/K_m$ (figura 5.12b). Esta ordenada al origen común indica que K_m no se afecta. El efecto de la inhibición no competitiva está dada por la interacción del I con la E y el ES en forma reversible, eliminando las moléculas de enzima activa en la solución. Esta inhibición no se puede compensar agregando S. Es rara la inhibición no competitiva clásica, pero se conocen ejemplos entre las enzimas alostéricas. En esos casos, es probable que el inhibidor no competitivo altere la conformación de la enzima, cuya forma todavía le permita seguir uniéndose al S pero sin poder catalizar reacción alguna.

La mayor parte de las enzimas no se apega a la forma clásica de inhibición no competitiva, donde no cambia K_m. En la mayoría de los casos se afectan tanto la $V_{máx}$ como la K_m, ya que la afinidad del inhibidor hacia la E es distinta que hacia ES. En esos casos se suelen llamar de inhibición mixta.

D. Usos de la inhibición enzimática

La inhibición enzimática reversible permite contar con un método poderoso para determinar la actividad enzimática y para alterarla en el tratamiento de enfermedades. Se puede obtener información acerca de la forma y de la reactividad química del sitio activo de una enzima a partir de experimentos que impliquen una serie de inhibidores competitivos con estructuras alteradas en forma sistemática.

La industria farmacéutica recurre a estudios de inhibición enzimática para diseñar medicamentos de uso clínico. En muchos casos se usa un inhibidor natural de una enzima como punto de partida para diseñar un medicamento. En lugar de usar síntesis aleatorias y determinar inhibidores potenciales, algunos investigadores están recurriendo a un método más eficiente llamado diseño racional de un fármaco. En teoría, con el banco de conocimientos tan amplio acerca de la estructura de las enzimas, hoy pueden diseñarse inhibidores en forma racional que se ajusten al sitio activo de determinada enzima. Los efectos de un compuesto sintético se determinan primero en enzimas aisladas, y después en sistemas biológicos. Aun cuando un compuesto desarrolle una actividad inhibidora adecuada, se pueden encontrar otros problemas. Por ejemplo, puede ser que el fármaco no entre a las células diana, o que se metabolice muy rápido y se convierta en un compuesto inactivo, o que sea tóxico al organismo huésped, o que la célula diana pueda desarrollar resistencia al agente en estudio.

Los progresos en la síntesis de fármacos o medicamentos se ejemplifican por el diseño de una serie de inhibidores de la enzima purina nucleósido fosforilasa. Esta enzima cataliza una reacción de degradación entre fosfato y el nucleósido de guanosina cuya estructura se observa en la figura 5.13a. Con modelado por computadora, se diseñaron las estructuras de inhibidores potenciales y se ajustaron al sitio activo de la enzima. Uno de tales compuestos (figura 5.13b) fue sintetizado y se encontró que es 100 veces

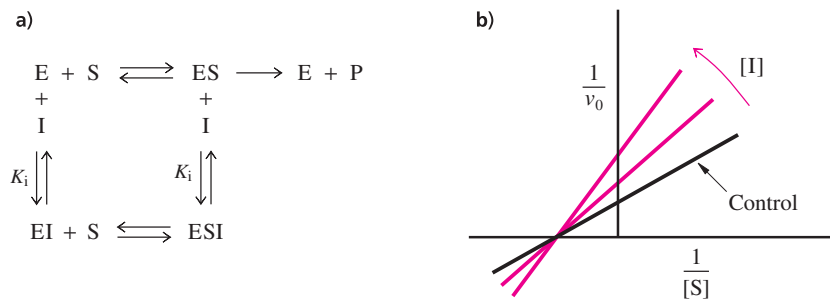


Figura 5.12 ▶
Inhibición no competitiva clásica. **a)** Esquema cinético que ilustra el enlace de I con E o con ES. **b)** Gráfica de doble recíproco. $V_{máx}$ disminuye, pero K_m permanece igual.

más inhibidor que cualquier compuesto obtenido con el método tradicional de aproximación por ensayo y error. Se espera que el método de diseño racional produzca medicamentos adecuados para tratar afecciones de autoinmunidad como artritis reumatoide y esclerosis múltiple.

5.8 Inhibición enzimática irreversible

En contraste con un inhibidor enzimático reversible, un inhibidor enzimático irreversible forma un enlace covalente estable con una molécula de enzima y elimina así las moléculas del sitio activo en la población enzimática. Típicamente, la inhibición irreversible ocurre por alquilación o acilación de la cadena lateral de un residuo de aminoácido en el sitio activo. Hay muchos inhibidores irreversibles naturales, al igual que hay ejemplos sintéticos que se describirán aquí.

Una aplicación importante de los inhibidores irreversibles es la identificación de residuos de aminoácidos en el sitio activo, por sustitución específica de sus cadenas laterales reactivas. En este proceso, un inhibidor irreversible que sólo reacciona con un tipo de aminoácido se incuba con una solución de la enzima, la que a continuación es analizada para determinar su pérdida de actividad. Las cadenas laterales ionizables se modifican con reacciones de acilación o alquilación. Por ejemplo, los grupos amino libres, como el grupo ε-amino de la lisina, reaccionan con un aldehído para formar una base de Schiff, la cual se puede estabilizar por reducción con borohidruro de sodio ($NaBH_4$) (figura 5.14).

El gas nervioso fluorofosfato de diisopropilo (DFP, de *diisopropyl fluorophosphate*) es un químico del grupo de compuestos orgánicos de fósforo que inactivan a las hidrolasas con una serina reactiva como parte del sitio activo. A estas enzimas se les llama serina proteasas o serina esterasas, dependiendo de la especificidad de su reacción. La quimotripsina una serina proteasa, es una importante enzima digestiva, que es inhibida en forma irreversible por el DFP (figura 5.15, página 148). El DFP reacciona con el residuo de serina en el sitio activo de la quimotripsina (Ser-195) y produce diisopropilfosforil-quimotripsina. En agricultura se usan algunos inhibidores organofósforados como insecticidas; otros, como el DFP, son buenos reactivos en la investigación de enzimas. Los gases nerviosos originales de organofósforo son venenos de toxicidad extrema, desarrollados para usos militares. La acción biológica principal de dichos venenos es la inhibición irreversible de la acetilcolinesterasa, una serina esterasa que cataliza la hidrólisis de la acetilcolina, un neurotransmisor. Cuando la acetilcolina liberada de una célula nerviosa activada se une a su receptor en una segunda célula nerviosa, activando el impulso nervioso. La acción de la acetilcolinesterasa restaura a la célula a su estado de reposo. La inhibición de esta enzima puede causar parálisis.

Los inhibidores reversibles con estructuras que les permitan unirse en forma específica a un sitio activo son más útiles que los reactivos generales de sustitución. Estos inhibidores se llaman reactivos dirigidos al sitio activo, o **marcadores de afinidad**. El fosfato de bromohidroxiacetona es un marcador de afinidad para la triosa fosfato isomerasa, que cataliza la interconversión de fosfato de dihidroxiacetona y el 3-fosfato de gliceraldehído. Este inhibidor reacciona con la cadena lateral de un residuo de glutamato de la enzima (figura 5.16, página 148). Con experimentos como éste se identificó que el Glu-165 es un componente del sitio activo de la triosa fosfatoisomerasa.

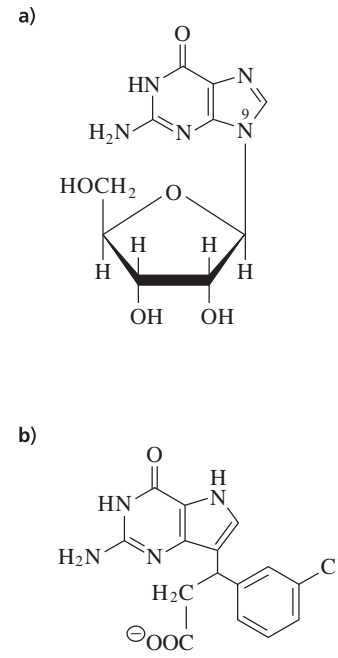
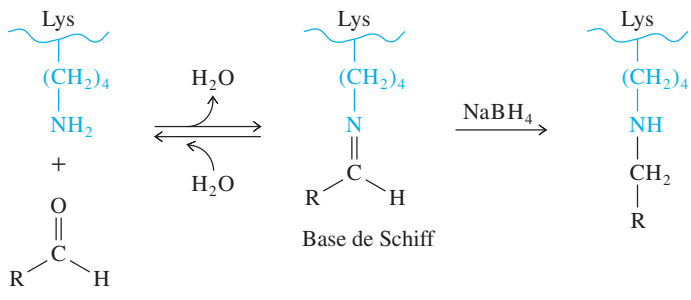


Figura 5.13 ▲
Comparación de un sustrato y un inhibidor diseñado, de la purina nucleósido fosforilasa. Los dos sustratos de esta enzima son guanosina y un fosfato inorgánico. **a)** Guanosina. **b)** Un inhibidor potente de la enzima. El N-9 de la guanosina se ha sustituido por un átomo de carbono. El anillo de benceno clorado se une al sitio de unión de azúcares con la enzima, y la cadena lateral de acetato se enlaza con el sitio de unión del fosfato.

En la sección 6.4A se presentan los detalles de esta reacción de isomerasa.



◀ **Figura 5.14**
Reacción del grupo ε-amino del residuo de lisina con un aldehído. La reducción de la base de Schiff con borohidruro de sodio ($NaBH_4$) forma una enzima sustituida estable.

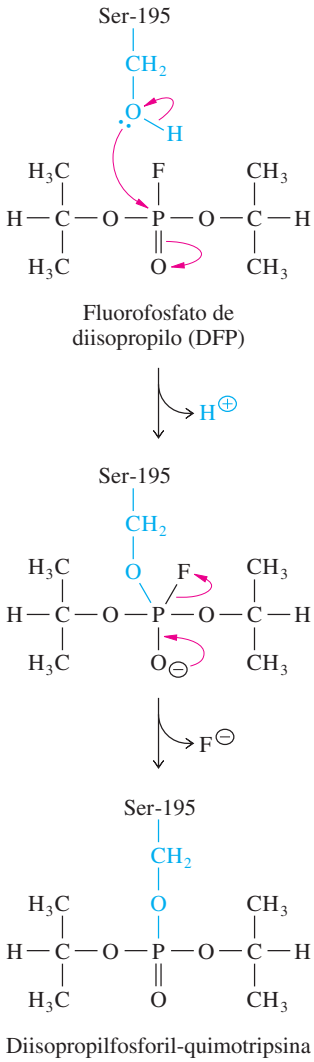


Figura 5.15 ▲
Reacción de fluorofosfato de diisopropilo (DFP) con un solo residuo de serina, muy nucleofílico (Ser-195) en el sitio activo de la quimotripsina; produciendo diisopropilfosforil-quimotripsina, inactiva. El DFP inactiva las serina proteasas y serina esterasas.

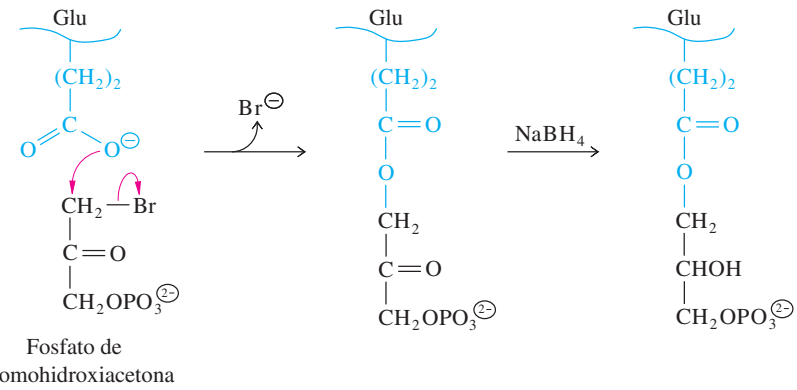


Figura 5.16 ▲
Inhibición irreversible de la triosa fosfato isomerasa. El análogo 1-bromo del fosfato de dihidroxiacetona reacciona con la cadena lateral del residuo de glutamato del sitio activo. La reducción del grupo carbonilo del sustituyente mediante $NaBH_4$ evita la migración del indicador de afinidad hacia otro grupo.

5.9 Enzimas alostéricas

Las enzimas alostéricas son enzimas cuyas propiedades son afectadas por cambios en la estructura. Los cambios estructurales son ocasionados por interacción con moléculas pequeñas. Se planteó un ejemplo de alosterismo en el capítulo anterior al examinar la unión del oxígeno a la hemoglobina. Con frecuencia, las enzimas alostéricas no presentan cinética clásica de Michaelis-Menten debido a su unión cooperativa del sustrato, como el caso de la hemoglobina, que no es enzima.

La figura 5.17 muestra una curva de v_0 en función de [S] para una enzima alostérica con enlazamiento cooperativo del sustrato. Las curvas sigmoides se deben a la transición entre dos estados de la enzima. En ausencia del sustrato, la enzima está en el estado T. La conformación de cada subunidad presenta una forma en la que se une ineficientemente al sustrato y la velocidad de la reacción es baja. A medida que la concentración de sustrato aumenta, las moléculas de enzima comienzan a unirse al sustrato, aunque la afinidad de la enzima en el estado T sea baja. Cuando una subunidad se une al sustrato sufre un cambio de conformación que la convierte al estado R y se efectúa la reacción. Las propiedades cinéticas de la subunidad enzimática en el estado T y en el estado R son bastante distintas; cada conformación podría, por sí misma, exhibir una cinética normal de Michaelis-Menten.

El cambio de conformación en la subunidad que al principio se enlaza a una molécula de sustrato afecta las demás subunidades en la enzima multisubunidades. Las conformaciones de esas otras subunidades se desplazan hacia el estado R, donde es mucho mayor su afinidad hacia el sustrato. Ahora se pueden unir al sustrato a una concentración mucho menor que cuando se hallaban en el estado T.

5.10 Regulación de la actividad enzimática

Al principio de este capítulo se presentó una lista de las diversas ventajas que supone el uso de enzimas como catalizadores en reacciones bioquímicas. Es claro que la ventaja más importante es acelerar reacciones que de otro modo serían muy lentas para mantener la vida. Otra de las ventajas de las enzimas es que su actividad catalítica se puede regular de varias maneras. La *cantidad* de una enzima se puede controlar regulando la velocidad de su síntesis o de su degradación. Este modo de control se presenta en todas las especies, pero con frecuencia se tarda de muchos minutos a horas sintetizar nuevas enzimas o degradar las enzimas existentes.

En todos los organismos, el control rápido, a escala de segundos o menos, se puede lograr mediante modulación reversible de la actividad de **enzimas reguladoras**. En

este contexto las enzimas reguladoras se definen como aquellas cuya actividad se puede modificar en una forma que afecte la velocidad de una reacción catalizada por la enzima. (En muchos casos, tales enzimas reguladoras controlan un paso clave en una ruta metabólica. Cuando se describa la regulación de una ruta, a veces se designarán como **enzimas reguladoras** a las enzimas que regulan el flujo de metabolitos en una ruta). La actividad de una enzima regulada cambia como respuesta a señales del ambiente y permite que la célula responda a las condiciones variables, con ajuste de las velocidades de sus procesos metabólicos.

En general, las enzimas reguladoras se vuelven catalizadores más activos cuando aumenta la concentración de sus sustratos o cuando disminuyen las concentraciones de los productos de sus rutas metabólicas. Se vuelven menos activas cuando disminuyen las concentraciones de sus sustratos o cuando se acumulan los productos de sus rutas metabólicas. La inhibición de la única enzima inicial en una ruta conserva tanto materiales como energía, evitando la acumulación de compuestos intermedios y del producto final. Las enzimas reguladoras se pueden clasificar por el método de su modulación: modulación alostérica no covalente o modificación covalente.

Los fenómenos alostéricos son los responsables del control reversible de numerosas enzimas reguladoras. En la sección 4.13C se explicó cómo cambia la conformación de la hemoglobina y su afinidad hacia el oxígeno cuando se le une 2,3-*bis*fosfoglicerato. Muchas enzimas reguladoras también sufren transiciones alostéricas entre los estados activo (R) e inactivo (T), como se describió en la sección anterior. Estas enzimas disponen de un segundo sitio de unión para el ligando, alejado de sus centros catalíticos. Este segundo sitio se llama **sitio regulador** o sitio alostérico. Un inhibidor o activador alostérico, que también se llama modulador alostérico o efector alostérico, se une al sitio regulador y causa un cambio de conformación en la enzima reguladora. Este cambio de conformación es transmitido al sitio activo de la enzima, el cual cambia de forma lo suficiente para alterar su actividad. Los sitios regulador y catalítico son regiones físicamente diferentes de la proteína —en general se encuentran en dominios separados, y a veces en subunidades separadas. Las enzimas con regulación alostérica suelen ser más grandes que otras enzimas. (Nótese que también la actividad de una enzima reguladora se puede controlar por modificación covalente).

Primero se ha de examinar una enzima que presenta regulación alostérica (no covalente) y después se mencionarán algunas propiedades generales de tales enzimas. A continuación se describen dos teorías que se proponen para explicar la regulación alostérica en función de cambios en la conformación de las enzimas reguladoras. Por último, se describirá un grupo de enzimas reguladoras estrechamente relacionadas las cuales están sujetas a modificación covalente.

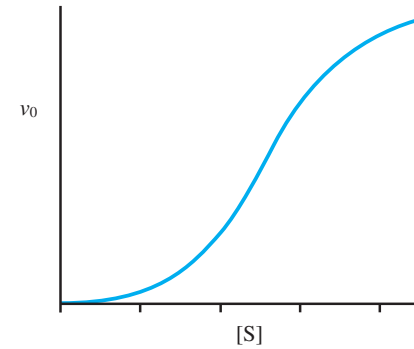
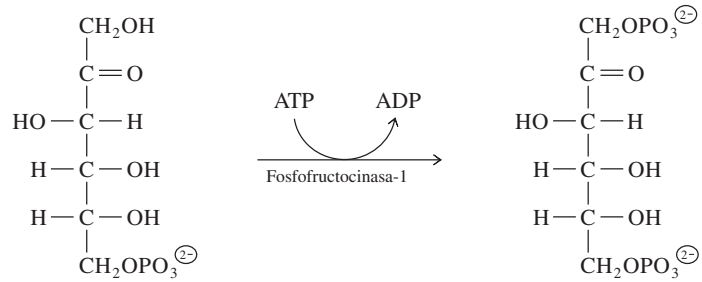


Figura 5.17▲
Gráfica de la velocidad inicial en función de la concentración del sustrato para una enzima alostérica que tiene enlazamiento cooperativo del sustrato.

En el capítulo 18 se describirá la aspartato transcarbamoilasa (ATCasa), otra enzima alostérica bien caracterizada.

A. Fosfofructocinasa, una enzima alostérica

La fosfofructocinasa-1 de la bacteria *Escherichia coli* es un buen ejemplo de inhibición y activación alostérica. La fosfofructocinasa-1 cataliza la fosforilación dependiente de ATP del 6-fosfato de fructosa para producir 1,6-*bis*-fosfato de fructosa y ADP (figura 5.18). Esta reacción es uno de los primeros pasos de la glucólisis, una ruta de degradación de la glucosa generadora de ATP (que se describirá en detalle en el capítulo 11). El fosfoenolpiruvato (figura 5.19) es un compuesto intermedio, cercano al final de la ruta



Fructosa 6-fosfato

Fructosa 1,6-*bi*fosfato

◀Figura 5.18
Reacción catalizada por fosfofructocinasa-1.

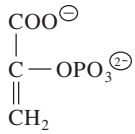


Figura 5.19▲
Fosfoenolpiruvato, intermediario de la glicólisis y un inhibidor alostérico de la fosfofructocinasa-1 de *Escherichia coli.*

glucolítica, es un inhibidor alostérico de la fosfofructocinasa-1 de *E. coli*. Cuando la concentración de fosfoenolpiruvato aumenta, significa que la ruta metabólica está bloqueada más adelante de ese punto. La producción continua de fosfoenolpiruvato es evitada al inhibir la fosfofructocinasa-1.

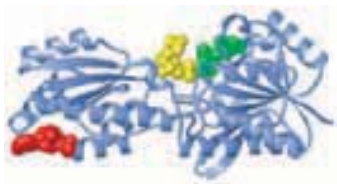
El ADP es un activador alostérico de la fosfofructocinasa-1. Eso puede parecer extraño, al contemplar la figura 5.18, pero téngase en mente que la ruta general de la glucólisis da como resultado la síntesis neta de ATP a partir de ADP. Si las concentraciones de ADP aumentan, esto implica que hay deficiencia de ATP y debe estimularse la glucólisis. Así, el ADP activa la fosfofructocinasa-1, a pesar del hecho (¿o debido al hecho?) de que el ATP es hidrolizado en esta reacción en particular.

El fosfoenolpiruvato y el ADP afectan la unión del sustrato 6-fosfato de fructosa con la fosfofructocinasa-1. Con experimentos cinéticos se ha demostrado que hay cuatro sitios de enlace en la fosfofructocinasa-1 para el 6-fosfato de fructosa, y con experimentos para determinación de estructura se ha confirmado que la fosfofructocinasa-1 de *E. coli* (M_r 140 000) es un tetrámero formado por cuatro subunidades idénticas. La figura 5.20 muestra la estructura de la enzima acomplejada con sus productos, fructosa 1,6-*bi*fosfato y ADP, y una segunda molécula de ADP, un activador alostérico. Las cuatro cadenas alargadas se asocian simétricamente para formar dos dímeros en el oligómero nativo. Los dos productos están enlazados en el sitio activo, el cual está entre dos dominios de cada cadena —el ADP se une al dominio grande y el 1,6-*bi*fosfato de fructosa se enlaza principalmente al dominio pequeño.

Una propiedad notable de la estructura de la fosfofructocinasa-1 (y una propiedad general de las enzimas reguladoras) es la separación física del sitio activo y el sitio regulador en cada subunidad. (En algunas enzimas reguladoras, los sitios activo y regulador se hallan en distintas subunidades). El activador ADP se une a cierta distancia del sitio activo, en un orificio profundo entre las subunidades. Cuando el ADP se une al sitio regulador, la fosfofructocinasa-1 asume la conformación R, que tiene gran afinidad hacia el 6-fosfato de fructosa. Cuando el fosfoenolpiruvato, un compuesto más pequeño, se enlaza con el mismo sitio regulador, la enzima asume una conformación diferente, la conformación T, con menor afinidad hacia el 6-fosfato de fructosa. La transición entre las conformaciones se logra mediante una pequeña rotación de un dímero rígido respecto del otro. La cooperatividad de unión con el sustrato depende del movimiento concertado de un residuo de arginina en cada uno de los cuatro sitios de unión con 6-fosfato de fructosa, cerca de la interfase entre los dímeros. El movimiento de la cadena lateral de esta arginina alejándose del sitio activo hace descender la afinidad hacia el 6-fosfato de fructosa. En muchos organismos, la fosfofructocinasa-1 es más grande y está sujeta a una regulación alostérica más compleja que la de *E. coli*, como se verá en el capítulo 11.

Los activadores pueden afectar ya sea la $V_{máx}$, o la K_m o ambas. Es importante reconocer que la unión de un activador altera la estructura de una enzima y que esta alteración la convierte en una forma diferente que puede tener propiedades cinéticas distintas. En la mayor parte de los casos, las diferencias entre las propiedades cinéticas de las formas R y T son más complejas que las que se estudiaron con los inhibidores de enzima en la sección 5.7.

a)



b)

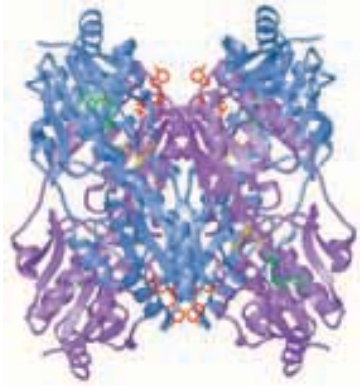


Figura 5.20▲
Conformación R de la fosfofructocinasa-1 de *E. coli.* La enzima es un tetrámero de cadenas idénticas. **a)** Una subunidad, representada por una cinta. Los productos, fructosa 1,6-*bi*fosfato (amarillo) y ADP (verde) están unidos en el sitio activo. El activador alostérico ADP (rojo) está enlazado en el sitio regulador. **b)** Tetrámero. Dos están en azul y dos en púrpura. Los productos, fructosa 1,6-*bi*fosfato (amarillo) y ADP (verde) están enlazados en los cuatro sitios activos. El ADP, activador alostérico (en rojo), está unido en los cuatro sitios reguladores en la interfase de las subunidades. [PDB 1PFK]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

B. Propiedades generales de las enzimas alostéricas

La examinación de las propiedades cinéticas y físicas de las enzimas alostéricas ha demostrado que poseen las siguientes características generales:

1. Las actividades de las enzimas alostéricas cambian debido a inhibidores y activadores metabólicos. Con frecuencia, dichos moduladores alostéricos no se parecen a los sustratos o a los productos de la enzima. Por ejemplo, el fosfoenolpiruvato (figura 5.19) no se parece al sustrato ni al producto (figura 5.18) de la fosfofructocinasa. Una consideración de las diferencias estructurales entre sustratos e inhibidores metabólicos llevó originalmente, a la conclusión de que los moduladores alostéricos están unidos a sitios reguladores, separados de los sitios catalíticos.

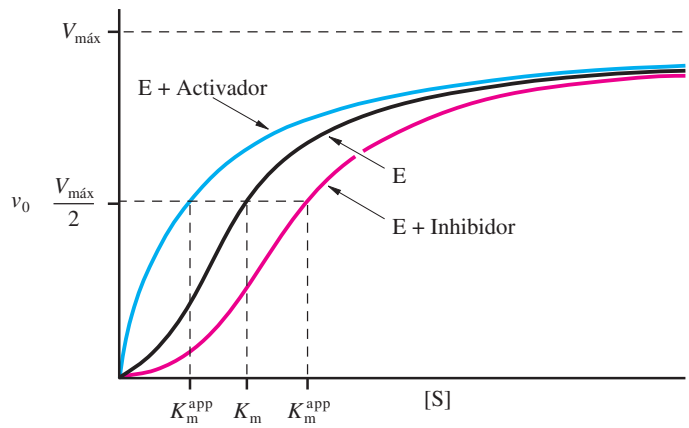
2. Los moduladores alostéricos se enlazan en forma no covalente a las enzimas que regulan. (Hay un grupo especial de enzimas reguladoras cuyas actividades son controladas por modificación covalente y se describen en la sección 5.10D). Muchos moduladores alteran la K_m de la enzima para un sustrato; otros, la $V_{máx}$ de la enzima. Los moduladores mismos no son alterados químicamente por la enzima.
3. Con pocas excepciones, las enzimas reguladoras son proteínas de subunidades múltiples. (Sin embargo, no todas las enzimas de subunidades múltiples son reguladoras). Las cadenas polipeptídicas individuales de una enzima reguladora pueden ser idénticas o diferentes. Para aquellas enzimas que tienen subunidades idénticas (como la fosfofructocinasa-1 de *E. coli*), cada cadena polipeptídica puede contener los sitios catalítico y regulador a la vez y el oligómero es un complejo simétrico que con frecuencia posee dos o cuatro cadenas de proteína. Las enzimas reguladoras formadas por subunidades diferentes tienen ordenamientos más complejos, pero en general simétricos.
4. Toda enzima sujeta a regulación alostérica posee cuando menos un sustrato para el cual la curva de v_0 en función del [S] es sigmoidea en lugar de hiperbólica (sección 5.9). La fosfofructocinasa-1 exhibe una cinética de Michaelis-Menten (hiperbólica) con respecto a un sustrato, ATP, pero cinética sigmoidea en relación con su otro sustrato, el 6-fosfato de fructosa. La curva sigmoidea es causada por la cooperación positiva del enlace del sustrato, lo cual es posible por la presencia de múltiples sitios de enlace del sustrato en la enzima.

La figura 5.21 ilustra el papel regulador que puede desempeñar el enlazamiento cooperativo. La adición de un activador puede desplazar la curva sigmoidea hacia una forma hiperbólica, con descenso de la K_m aparente (la concentración de sustrato necesaria para la mitad de la saturación) y aumento de la actividad a determinada [S]. La adición de un inhibidor puede aumentar la K_m de la enzima y reducir su actividad a una concentración particular del sustrato.

La transición alostérica R $\rightleftharpoons$ T entre las conformaciones activa e inactiva de una enzima reguladora es rápida. La relación de R a T se controla por las concentraciones de los diversos ligandos y por las afinidades relativas de cada conformación hacia tales ligandos. En los casos más simples, las moléculas de sustrato y activador sólo se unen a la enzima en el estado R (E_R) y las moléculas de inhibidor sólo se unen a la enzima en el estado T (E_T).

$$E_T{-}I \underset{I}{\overset{I}{\rightleftharpoons}} E_T \xrightleftharpoons{\text{Transición alostérica}} E_R \underset{S}{\overset{S}{\rightleftharpoons}} E_R{-}S \qquad \textbf{(5.28)}$$

La adición de S causa un aumento en la concentración de la enzima en su conformación R. Al revés, la adición de I aumenta la proporción de la especie T.



◀ Figura 5.21
Papel de la cooperatividad de enlace en la regulación. La actividad de una enzima alostérica con curva sigmoidea de enlazamiento se puede alterar marcadamente cuando un activador o un inhibidor se unen a la enzima. La adición de un activador puede hacer descender la K_m aparente, elevando la actividad a determinada [S]. Al revés, la adición de un inhibidor puede elevar la K_m aparente y producir menos actividad a una [S] dada.

Las moléculas de activador se enlazan de preferencia a la conformación R y causan un aumento en la relación R/T. Nótese que este esquema simplificado no muestra que haya muchos sitios de enlace que interactúan, tanto para S como para I.

Algunos inhibidores alostéricos son competitivos no clásicos (figura 5.8b). Por ejemplo, la figura 5.21 describe una enzima que tiene una K_m aparente mayor para su sustrato en presencia de un inhibidor alostérico, pero una $V_{máx}$ que no cambia. En consecuencia, el modulador alostérico es un inhibidor competitivo.

Algunas enzimas reguladoras presentan patrones de inhibición no competitiva (figura 5.8d). El enlazamiento de un modulador al sitio regulador no evita que el sustrato se enlace, pero parece que distorsiona la conformación del sitio activo lo suficiente para disminuir la actividad de la enzimática.

C. Dos teorías de la regulación alostérica

Hay dos modelos que explican la cooperatividad de enlazamiento de ligandos a proteínas oligoméricas que se han ganado el reconocimiento general. Tanto la teoría concertada como la teoría secuencial describen las transiciones cooperativas en términos cuantitativos simples. La última es una teoría más general; la primera es adecuada para explicar muchas enzimas alostéricas.

La **teoría concertada**, o teoría inducida por simetría, fue inventada para explicar la unión cooperativa de ligandos idénticos como los sustratos. Se supone que hay un sitio de unión por cada subunidad y para cada ligando; también que la conformación de cada subunidad está restringida por su asociación con otras subunidades, y que cuando la proteína cambia de conformación conserva su simetría molecular (figura 5.22a). Así, hay dos conformaciones en equilibrio, la R (con gran afinidad hacia el sustrato) y la T (con baja afinidad hacia el sustrato). La unión con el sustrato desplaza al equilibrio. Cuando la conformación de la proteína cambia, también lo hace la afinidad de sus sitios de unión a ligandos. La teoría concertada se amplió para incluir la unión de moduladores

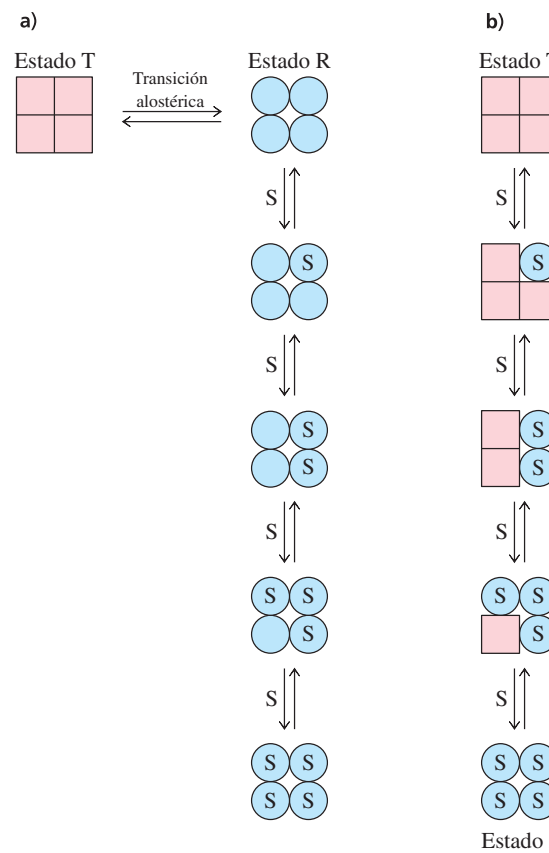


Figura 5.22 ▶
Dos modelos de cooperatividad de enlazamiento de sustrato (S) con una proteína tetramérica. **a)** En el modelo concertado simplificado, todas las subunidades están en el estado R o en el estado T y S sólo se enlaza al estado R. **b)** En el modelo secuencial, el enlazamiento de S a una subunidad sólo convierte esa subunidad a la conformación R. Las subunidades vecinas pueden quedar en el estado T o pueden asumir las conformaciones entre T y R.

alostéricos y se puede simplificar suponiendo que el sustrato sólo se enlaza al estado R y que el inhibidor alostérico sólo se une al estado T. La teoría concertada se basa en la simetría estructural observada en las enzimas reguladoras. Parece indicar que todas las subunidades de una determinada molécula de proteína tienen la misma conformación, sean todas R o todas T; esto es, conservan su simetría cuando pasan del estado T al estado R. Los datos experimentales obtenidos con varias enzimas pueden explicarse con esta sencilla teoría. Por ejemplo, muchas de las propiedades de la fosfofructocinasa-1 de *E. coli* se ajustan a la teoría concertada. En la mayor parte de los casos la teoría concertada no explica en forma adecuada todas las observaciones respecto a determinada enzima. Su comportamiento es más complejo que el que sugiere este sencillo modelo de dos estados.

La **teoría secuencial**, o teoría inducida por ligando, es una proposición más general. Se basa en la idea de que un ligando puede inducir un cambio en la estructura terciaria de la subunidad a la que se une. Este complejo de subunidad-ligando puede cambiar las conformaciones de las subunidades vecinas hasta diversos grados. Al igual que la teoría concertada, la teoría secuencial asume que sólo una forma tiene una gran afinidad hacia el ligando, pero difiere de la teoría concertada porque permite la existencia de subunidades de mucha y poca afinidad en una proteína de multisubunidades (figura 5.22b). La teoría secuencial puede explicar la cooperatividad negativa, una disminución en la afinidad, cuando las moléculas de ligando se unen a un oligómero. La cooperatividad negativa se presenta en una cantidad relativamente pequeña de enzimas. La teoría secuencial hace lo que la teoría concertada, que su requirimiento de simetría, sea un caso límitante y sencillo.

Se han hecho extensas pruebas de las teorías concertada y secuencial mediante hemoglobina, una proteína enlazante del oxígeno. Recuérdese que la hemoglobina no es un tetrámero simple sino más bien un dímero de dímeros $\alpha\beta$ porque cada subunidad α interactúa con una subunidad β específica (sección 4.12). También recuérdese que el O_2 se enlaza débilmente al estado T de la hemoglobina y con más fuerza al estado F (sección 4.13). Los resultados compuestos de muchos tipos de experimentos indican que la estructura terciaria de una subunidad de hemoglobina cambia cuando se une con el oxígeno. La estructura cuaternaria del oligómero permanece inalterada hasta que el oxígeno se combina al menos con una subunidad en cada dímero $\alpha\beta$ La unión de una molécula de oxígeno con el segundo dímero causa un cambio en la estructura cuaternaria —el movimiento relativo de los dímeros $\alpha\beta$ se describió en la sección 4.13B. Los cambios de estructura terciaria y cuaternaria se modelan en la figura 5.23. El proceso del enlazamiento del oxígeno con la hemoglobina tiene aspectos tanto de la teoría secuencial como de la concertada: la alteración independiente de la estructura terciaria dentro de las subunidades y una transición concertada en la estructura cuaternaria.

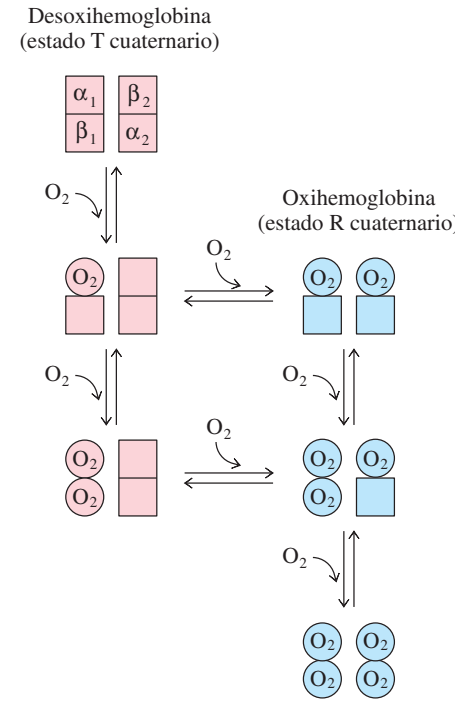


Figura 5.23▲
Cambios de conformación durante la unión de oxígeno con hemoglobina. Cambia la estructura terciaria de una sola cadena cuando se enlaza el oxígeno. La estructura cuaternaria de la hemoglobina cambia del estado T al estado R sólo cuando al menos una subunidad de cada dímero $\alpha\beta$ es oxigenado. Sólo se muestran cuatro de las ocho especies parcialmente oxigenadas posibles (es decir, el oxígeno se podría unir inicialmente a una cadena α o a una cadena β, etc.). [Adaptado de Ackers, G. K., Doyle, M. L., Myers, D., y Daugherty, M. A. (1992). Molecular code for cooperativity in hemoglobin. *Science* 255:54-63].

D. Regulación por modificación covalente

La actividad de una enzima se puede modificar por la fijación covalente y la eliminación de grupos en la cadena polipeptídica. La regulación por modificación covalente suele ser más lenta que la regulación alostérica que se describió arriba. La modificación covalente de las enzimas reguladas es reversible, pero suele requerir enzimas modificadoras adicionales para su activación e inactivación. Las enzimas modificadoras pueden ellas mismas ser reguladas alostéricamente o por modificación covalente. Se cree que las enzimas controladas por modificación covalente en general sufren transiciones R $\rightleftharpoons$ T. Pueden quedar congeladas en una u otra conformación por una sustitución covalente.

El tipo más común de modificación covalente es la fosforilación de uno o más residuos específicos de serina, aunque en algunos casos se fosforilan residuos de treonina, tirosina o histidina. Una enzima, llamada proteincinasa cataliza la transferencia del grupo fosforilo terminal del ATP al residuo adecuado de serina en la enzima reguladora. La fosfoserina de la enzima reguladora se hidroliza por la actividad de una proteinfosfatasa, con lo cual se libera el fosfato y la enzima regresa a su estado desfosforilado. Las enzimas individuales difieren respecto a su forma fosfo o desfosfo en que son activas.

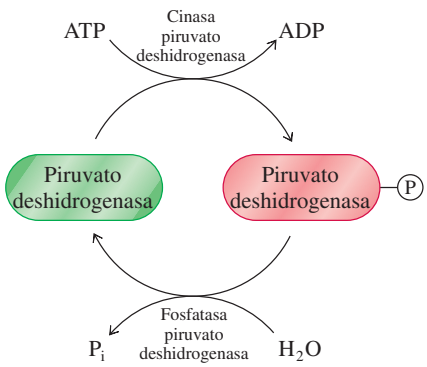


Figura 5.24 ▲
Regulación de la piruvato deshidrogenasa de mamíferos. La piruvato deshidrogenasa, una enzima interconvertible, se inactiva por fosforilación catalizada por la cinasa piruvato deshidrogenasa. Se reactiva por hidrólisis de su residuo fosfoserina, catalizada por una hidrolasa alostérica llamada fosfatasa piruvato deshidrogenasa.

En mamíferos, las reacciones que intervienen en la regulación de la piruvato deshidrogenada por modificación covalente se muestran en la figura 5.24. La piruvato deshidrogenasa cataliza una reacción que conecta la ruta de la glucólisis con el ciclo del ácido cítrico. La fosforilación de la piruvato deshidrogenasa catalizada por la enzima alostérica cinasa piruvato deshidrogenasa, inactiva a la deshidrogenasa. La cinasa se puede activar por cualquiera de varios metabolitos. La piruvato deshidrogenasa fosforilada se reactiva bajo condiciones metabólicas diferentes por hidrólisis de su residuo de fosfoserina catalizada por la fosfatasa piruvato deshidrogenasa. Esta fosfatasa se activa alostéricamente por Ca^{2+}.

5.11 Complejos multienzimáticos y enzimas multifuncionales

En algunos casos hay distintas enzimas que catalizan reacciones consecutivas en la misma ruta y se hallan unidas entre sí en un complejo multienzimático. En otros casos, se pueden encontrar distintas actividades en una sola cadena polipeptídica multifuncional. La presencia de actividades múltiples en una sola cadena de polipéptido suele ser el resultado de un evento de fusión de genes.

Algunos complejos multienzimáticos son bastante estables. Habrá ocasión de estudiar algunos de ellos en otros capítulos al describir la biosíntesis de ácidos grasos y ácidos nucleicos. En otros complejos multienzimáticos, las proteínas pueden estar asociadas más débilmente, principalmente por complementariedad estérica y electrostática, y por uniones hidrofóbicas. Ya que tales complejos se disocian con facilidad, se ha dificultado demostrar su existencia y su importancia. Otra forma en que se pueden asociar las enzimas es por fijación a las membranas o a componentes del citoesqueleto.

Las ventajas metabólicas de los complejos multienzimáticos y de las enzimas multifuncionales incluyen la posibilidad de **canalización del metabolito**. La canalización de reactivos entre los sitios activos se puede dar cuando el producto de una reacción es transferido en forma directa al siguiente sitio activo, sin entrar al interior solvente. Ello puede aumentar muchísimo la velocidad de una reacción al disminuir los tiempos de tránsito de los intermediarios entre las enzimas y producir localmente altas concentraciones de ellos. También la canalización puede proteger químicamente a los intermedios lábiles contra la degradación del solvente. La canalización metabólica es una forma en la que las enzimas pueden acoplar adecuadamente reacciones separadas.

Uno de los ejemplos mejor caracterizados de la canalización es el de la bienzima triptofano sintasa, que cataliza los dos últimos pasos de la biosíntesis del triptófano (sección 18.5C). La triptofano sintasa cuenta con un túnel que conduce a un reactivo entre sus dos sitios activos. La estructura de la enzima no sólo evita que el reactivo se pierda en el interior del solvente, sino que también proporciona un control alostérico para que las reacciones se efectúen en fase en los dos sitios activos. Varias enzimas disponen de dos o tres sitios activos unidos por un túnel molecular. Otro mecanismo de canalización de metabolitos es el guiado a lo largo de una trayectoria de cadenas laterales básicas de aminoácidos en la superficie de enzimas acopladas. Los metabolitos (la mayoría de los cuales tiene carga negativa) son dirigidos entre los sitios activos por medio de la trayectoria superficial con carga electrostática positiva. La búsqueda de complejos enzimáticos y la evaluación de sus papeles catalíticos y reguladores es un área extremadamente activa en la investigación de la química de las enzimas.

Resumen

1. Las enzimas, los catalizadores de los organismos vivos, son notables por su eficiencia catalítica y su especificidad hacia sustratos y reacciones. Con pocas excepciones, las enzimas son proteínas o proteínas más cofactores. Las enzimas se agrupan en seis clases (oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas) de acuerdo con la naturaleza de las reacciones que catalizan.

2. La cinética de una reacción química se puede describir con una ecuación de velocidad.

3. Las enzimas y los sustratos forman complejos enzima-sustrato no covalentes. En consecuencia, las reacciones enzimáticas son de primer orden en forma característica respecto a la concentración de la enzima, y en forma típica muestran una dependencia hiperbólica respecto a la concentración del sustrato. La hipérbola se describe con la ecuación de Michaelis-Menten.
4. La velocidad máxima ($V_{máx}$) se alcanza cuando la concentración del sustrato es de saturación. La constante de Michaelis (K_m) es igual a la concentración del sustrato cuando la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima, esto es, a media saturación de E con S.
5. La constante catalítica (K_{cat}) o número de recambio de una enzima es la cantidad máxima de moléculas de sustrato que pueden transformarse en producto por molécula (o por sitio activo) de enzima por segundo. La relación k_{cat}/K_m es la constante aparente de velocidad de segundo orden que gobierna la reacción de una enzima cuando el sustrato está diluido y no está saturando. La relación k_{cat}/K_m es una medida de la eficiencia catalítica de una enzima.
6. Se pueden obtener K_m y $V_{máx}$ a partir de gráficas de velocidad inicial con una serie de concentraciones de sustrato y una concentración fija de enzima.
7. Las reacciones de multisustrato pueden seguir un mecanismo secuencial con eventos de unión y liberación ordenados o aleatorios o con un mecanismo de ping-pong.
8. Los inhibidores hacen descender las velocidades de reacciones catalizadas por enzimas. Los inhibidores reversibles pueden ser competitivos (aumentan el valor aparente de K_m sin cambiar $V_{máx}$), acompetitivos (parecen disminuir proporcionalmente K_m y $V_{máx}$), o no competitivos (parecen disminuir $V_{máx}$ sin cambiar K_m). Los inhibidores irreversibles de enzima forman enlaces covalentes con la enzima.
9. Los moduladores alostéricos se unen a las enzimas en un sitio distinto al sitio activo y alteran la actividad enzimática. Hay dos modelos, el modelo concertado y el modelo secuencial, que describen la cooperatividad de las enzimas alostéricas. La modificación covalente, por lo general fosforilación, de ciertas enzimas reguladoras también puede regular la actividad enzimática.
10. Los complejos multienzimáticos y las enzimas multifuncionales tienen la ventaja de la canalización de metabolitos.

Problemas

1. Aplique la ecuación de Michaelis-Menten (ecuación 5.14) para demostrar lo siguiente:
   a) v_0 se vuelve independiente de [S] cuando [S] $\gg K_m$.
   b) La reacción es de primer orden con respecto a S cuando [S] $\ll K_m$.
   c) [S] = K_m cuando v_0 es la mitad de $V_{máx}$.

2. Se han medido las velocidades iniciales de la reacción entre α-quimotripsina y éster bencílico de tirosina [S] a seis distintas concentraciones de sustrato. Use los datos siguientes para llegar a una estimación razonable de los valores de $V_{máx}$ y K_m para este sustrato.

mM [S]	0.00125	0.01	0.04	0.10	2.0	10
v_0 (mM/mín)	14	35	56	66	69	70

3. a) ¿Por qué se usa el valor de k_{cat}/K_m para medir la eficiencia catalítica de una enzima?
   b) ¿Cuáles son los límites superiores de los valores de k_{cat}/K_m para las enzimas?
   c) Se dice que las enzimas con valores de k_{cat}/K_m que tienden a esos límites superiores han llegado a la "perfección catalítica". Explique por qué.

4. La anhidrasa carbónica (CA, de *carbonic anhydrase*) tiene una actividad 25 000 veces mayor ($k_{cat} = 10^6 s^{-1}$ o todavía mayor) que la orotidina monofosfato descarboxilasa (OMPD) ($k_{cat} = 40\ s^{-1}$). Sin embargo, la OMPD tiene una "aceleración de velocidad" 10^{10} veces mayor que la CA (tabla 5.2). Explique cómo es esto posible.

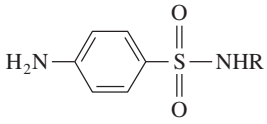
5. Una enzima que se apega a la cinética de Michaelis-Menten tiene una $K_m = 1\ \mu M$. La velocidad inicial es de 0.1 μM min^{-1} a una concentración de sustrato de 100 μM. ¿Cuál es la velocidad inicial cuando la [S] es igual a a) 1 mM, b) 1 μM o c) 2 μM?

6. El virus de inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1) codifica una proteasa ($M_r = 21\ 500$) que es esencial para ensamblar y madurar el virus. La proteasa cataliza la hidrólisis de un sustrato heptapéptido con una $k_{cat} = 1000\ s^{-1}$ y una $K_m = 0.075$ M.
   a) Calcule la $V_{máx}$ para la hidrólisis del sustrato cuando está presente la proteasa del VIH-1 a 0.2 mg ml^{-1}.
   b) Cuando el —C(O)NH— del heptapéptido se sustituye por —CH_2NH—, la proteasa del VIH-1 no puede escindir el derivado que resulta y actúa como inhibidor. Bajo las mismas condiciones experimentales que en la parte a) pero en presencia de 2.5 μM de inhibidor, la $V_{máx}$ es 9.3×10^{-3} M s^{-1}. ¿Qué clase de inhibición sucede? Este tipo de inhibición ¿es de esperarse para una molécula con esta estructura?

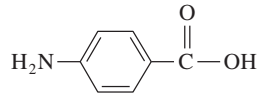
7. Trace una gráfica de v_0 contra [S] para una reacción enzimática típica a) en ausencia de inhibidor, b) en presencia de un inhibidor competitivo, y c) en presencia de un inhibidor no competitivo.

8. Las sulfonamidas (las sulfas) como la sulfanilamida son productos antibacterianos que inhiben la enzima dihidropteroato sintasa (DS), necesaria en la síntesis del ácido fólico en las bacterias. No hay inhibidor enzimático correspondiente en los animales porque el ácido fólico es una vitamina esencial que no es posible sintetizar. Si el ácido *p*-aminobenzoico (PABA) es un sustrato para la DS, ¿qué tipo de inhibición puede ser anticipada para la enzima sintasa bacteriana en presencia de sulfonamidas? Trace una gráfica de doble recíproco

para este tipo de inhibición con ejes bien rotulados e identifique las líneas no inhibidas e inhibidas.



Sulfonamidas
(R = H, sulfanilamida)



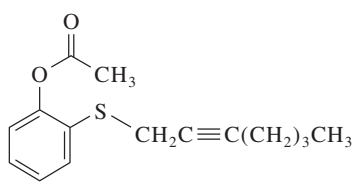
Ácido *p*-aminobenzoico

9. a) La fumarasa es una enzima en el ciclo del ácido cítrico que cataliza la conversión de fumarato en L-malato. Con las concentraciones de fumarato (sustrato) y las velocidades iniciales que se ven abajo, trace una gráfica de Lineweaver-Burk y determine la $V_{máx}$ y K_m para la reacción catalizada por la fumarasa.

Fumarato (mM)	Velocidad (mmol l^{-1} min^{-1})
2.0	2.5
3.3	3.1
5.0	3.6
10.0	4.2

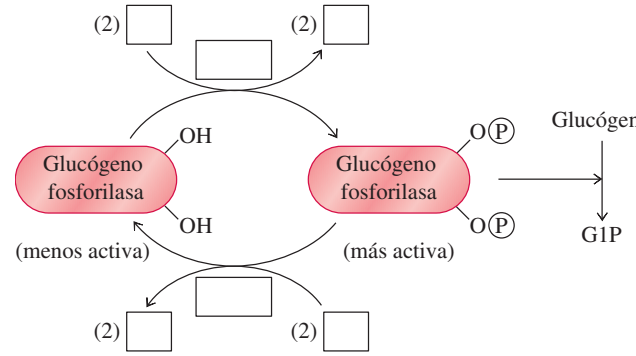
b) El peso molecular de la fumarasa es 194 000 y la enzima está formada por cuatro subunidades idénticas, cada una con un sitio activo. Si la concentración de enzima es 1×10^{-8} M para el experimento de la parte a), calcule el valor de K_{cat} para la reacción de la fumarasa con fumarato. Nota: las unidades de k_{cat} son segundos recíprocos (s^{-1}).

10. Los efectos terapéuticos antiinflamatorios de la aspirina se deben a su inhibición de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2), implicada en la síntesis de prostaglandinas, que son mediadores en la inflamación, el dolor y en la fiebre. La aspirina inhibe en forma irreversible a la COX-2 al transferir en forma covalente un grupo acetilo a un residuo de serina en el sitio activo de la enzima. No obstante, el efecto secundario no deseado de irritación gástrica se debe a la inhibición irreversible de la enzima ciclooxigenasa-1 (COX-1) relacionada con el intestino, por la aspirina. La COX-1 interviene en la síntesis de prostaglandinas que regulan la secreción de la mucina gástrica, un protector del estómago contra los ácidos. El APHS, un análogo de la aspirina, se sintetizó y demostró ser más de 60 veces selectivo como inhibidor de COX-2 que de COX-1, indicando que podría ser un medicamento antiinflamatorio con efectos secundarios gastrointestinales mucho menores. Dibuje la estructura del complejo inactivado de enzima COX-2-inhibidor con APHS. Ya que la aspirina y sus análogos estructurales actúan en el sitio activo de las enzimas COX ¿ellas serán ejemplo de inhibición competitiva?



APHS

11. La regulación enzimática covalente desempeña un papel importante en el metabolismo del glucógeno muscular, una molécula almacenadora de energía. La forma fosforilada activa de la glucógeno fosforilasa(GP) cataliza la degradación de glucógeno en 1-fosfato de glucosa. Use como modelo la piruvato deshidrogenasa (figura 5.24) para llenar los cuadros de la figura de abajo relacionada con la activación e inactivación de la glucógeno fosforilasa muscular.



12. Las enzimas reguladoras en las rutas metabólicas se encuentran con frecuencia en el primer paso, exclusivo de cada ruta. ¿Cómo es que en este punto la regulación mejora la eficiencia metabólica?

13. La ATCasa es una enzima reguladora al principio de la ruta de biosíntesis de nucleótidos de pirimidina. La ATCasa tiene cooperatividad positiva, es activada por ATP e inhibida por citidina trifosfato (CTP), un nucleótido de pirimidina. Tanto ATP como CTP afectan la K_m para el sustrato de aspartato, pero no afectan la $V_{máx}$. En ausencia de ATP o CTP, la concentración de aspartato necesaria para alcanzar la mitad de la velocidad máxima es de unos 5 mM a concentraciones de saturación del segundo sustrato, el fosfato de carbamoílo. Trace una gráfica de v_0 en función de [aspartato] para la ATCasa e indique cómo afectan CTP y ATP la v_0 cuando [aspartato] = 5 mM.

14. La gelatina es colágena procesada proveniente de las articulaciones de animales. Cuando se mezcla gelatina con agua caliente, la estructura de triple hélice se desenrolla y se separan las cadenas, transformándose en hélices aleatorias que se disuelven en el agua. Cuando la mezcla con gelatina disuelta se enfría, la colágena forma una matriz que atrapa el agua; el resultado es que la mezcla se convierte en la masa semisólida que se conoce como Jell-O™. Las instrucciones en una caja de gelatina comprenden las siguientes: "Enfríe hasta que espese ligeramente, a continuación agregue de 1 a 2 tazas de frutas o verduras cocidas o crudas. La piña fresca o congelada debe cocinarse antes de agregarla". Si la piña no se cocina, la gelatina no cuaja bien. La piña pertenece a un grupo de plantas llamadas Bromelias. La piña contiene una proteasa llamada bromelina. Explique por qué debe cocinarse la piña antes de agregarla a la gelatina.

15. La familia de citocromo P450, de las enzimas monooxigenasas, intervienen en la eliminación de compuestos extraños (incluyendo medicamentos) del organismo. Las P450 se encuentran en muchos tejidos, que incluyen al hígado, intestino, tejidos nasales y pulmonares. Por cada medicamento que se aprueba para uso humano por parte de la Food and Drug Administration en EUA, la empresa farmacéutica debe investigar

su metabolismo por el citocromo P450. Muchas de las interacciones adversas que se conocen entre medicamentos suceden como resultado de las interacciones con las enzimas del citocromo P450. Una parte importante de los agentes farmacológicos son metabolizados por una de las enzimas P450, la P450 3A4. Se sabe que la P450 3A4 en intestino de humanos, metaboliza al midazolam, un sedante, y forma un producto hidroxilado, el 1′-hidroximidazolam. Los datos cinéticos que siguen son de la reacción catalizada por P450 3A4.

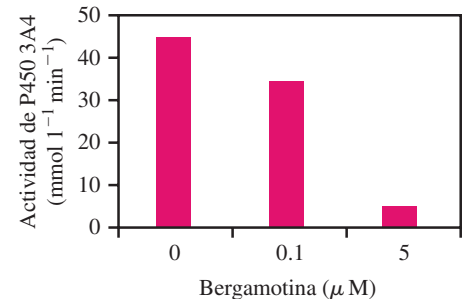
Midazolam (μM)	**Velocidad de formación de producto (pmol l^{-1} min^{-1})**	**Velocidad de formación de producto en presencia de 0.1 μM de cetoconazol (pmol l^{-1} min^{-1})**
1	100	11
2	156	18
4	222	27
8	323	40

a) De acuerdo con las dos primeras columnas, determine la K_m y la $V_{máx}$ para la enzima realizando una gráfica de Lineweaver-Burk.

b) Se sabe que el cetoconazol, un antifungal, causa interacciones adversas entre medicamentos cuando se administra con midazolam. Use los datos de la tabla para determinar el tipo de inhibición que ejerce el cetoconazol sobre P450 que cataliza la hidroxilación de midazolam.

[Adaptado de Gibbs, M.A., Thummel, K.E., Shen, D.D. y Kunze, K.L. *Drug Metab. Dispos*. (1999) 27:180-187.]

16. A los pacientes que toman ciertos medicamentos se les advierte que eviten tomarlos con jugo de toronja, el cual contiene muchos compuestos, entre ellos bergamotina. El citocromo P450 3A4 es una monooxigenasa que se sabe metaboliza medicamentos y los convierte en sus formas inactivas. Se obtuvieron los siguientes resultados cuando se midió la actividad de P450 3A4 en ausencia o en presencia de bergamotina.



a) ¿Cuál es el efecto de añadir bergamotina a la reacción catalizada con P450?

b) ¿Por qué podría ser peligroso que un paciente tomara ciertos medicamentos con jugo de toronja?

[Adaptado de Wen, Y.H., Sahi, J., Urda, E., Kalkarni, S., Rose, K., Zheng, X., Sinclair, J.F., Cai, H., Strom, S.C., y Kostrubsky, V.E. *Drug Metab. Dispos.* (2002) 30:977-984].

Lecturas seleccionadas

Catálisis enzimática

Fersht, A. (1985). *Enzyme Structure and Mechanism*, 2nd ed. (Nueva York: W. H. Freeman). Una descripción de los mecanismos y las funciones de las enzimas.

Miller, B. G., y Wolfenden, R. (2002). Catalytic proficiency: The unusual case of OMP decarboxylase. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 847-885. Este artículo de revisión describe el concepto de aumento de velocidad y presenta muchos ejemplos.

Sigman, D. S., y Boyer, P. D., eds. (1990-1992). *The Enzymes*, Vols. 19 y 20, 3rd ed. (San Diego: Academic Press). Estos dos volúmenes contienen capítulos sobre los principios básicos de catálisis, cinética de enzimas, inhibición y mecanismos de diversas enzimas.

Webb, E. C., ed. (1992). *Enzyme nomenclature 1992: Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes* (San Diego, Academic Press). Una lista de las seis clases de enzimas.

Cinética e inhibición enzimáticas

Bugg, C. E., Carson, W. M., y Mongtomery, J. A. (1993). Drugs by design. *Sci. Am.* 269(6):92-98.

Cleland, W. W. (1970). *Steady State Kinetics. The Enzymes*, Vol. 2, 3rd ed., P. D. Boyer, ed. (Nueva York: Academic Press), pp. 1-65. Métodos para estudiar la cinética de reacciones de multisustrato.

Cornish-Bowden, A. (1999). Enzyme kinetics from a metabolic perspective. *Biochem. Soc. Trans.* 27:281-284. Sugerencias acerca de cómo se pueden aplicar mediciones de inhibición al metabolismo celular.

Radzicka, A., y Wolfenden, R. (1995). A proficient enzyme. *Science* 267:90-93. Describe un ejemplo excelente de aceleración de la velocidad.

Segel, I. H. (1975). *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady State Enzyme Systems* (New York: Wiley-Interscience). Una descripción detallada del comportamiento y análisis cinéticos.

Enzimas reguladoras

Ackers, G. K., Doyle, M. L., Myers, D., y Daugherty, M. A. (1992). Molecular code for cooperativity in hemoglobin. *Science* 255:54-63.

Barford, D. (1991). Molecular mechanisms for the control of enzymic activity by protein phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* 1133:55-62.

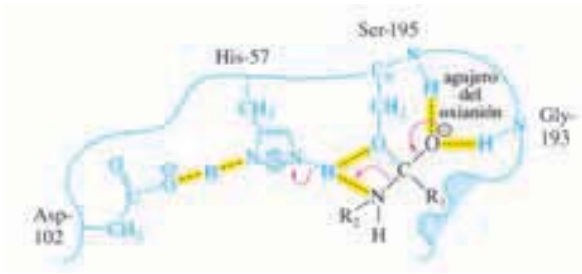
Hurley, J. H., Dean. A. M., Sohl, J. L., Koshland, D. E., Jr., y Stroud, R. M. (1990). Regulation of an enzyme by phosphorylation at the active site. *Science* 249:1012-1016. Describe el control de la actividad de la isocitrato deshidrogenasa por modificación covalente de un residuo enlazante.

Schirmer, T., y Evans, P. R. (1990). Structural basis of the allosteric behavior of phosphofructokinase. *Nature* 343:140-145. Comparación de distintas estructuras de complejos enzima-ligando de la fosfofructocinasa-1 bacteriana.

Canalización del metabolito

Pan, P., Woehl, E., y Dunn, M. F. (1997). Protein architecture, dynamics and allostery in tryptophan synthase channeling. *Trends Biochem. Sci.* 22:22-27.

Vélot, C., Mixon, M. B., Teige, M., y Srere, P. A. (1997). Model of a quinary structure between Krebs TCA cycle enzymes: a model for the metabolon. *Biochemistry* 36:14271-14276. Pruebas de que las enzimas débilmente unidas, catalizan pasos adyacentes en el ciclo del ácido cítrico.



6

capítulo seis

Mecanismos de las enzimas

En el capítulo anterior se describieron algunas propiedades generales de las enzimas. En este capítulo se estudiará con detalle molecular, cómo las enzimas catalizan reacciones. Los mecanismos enzimáticos individuales se han deducido mediante una diversidad de métodos, que incluyen experimentos cinéticos, estudios estructurales de proteínas y análisis de reacciones con modelos no enzimáticos. Los resultados de esos estudios indican que la extraordinaria capacidad catalítica de las enzimas se debe a propiedades físicas y químicas sencillas, especialmente el enlazamiento y la colocación adecuada de los sustratos en los sitios activos de las enzimas. Se han combinado la química, la física y la bioquímica para esclarecer gran parte del misterio de las enzimas, y la tecnología del ADN recombinante ahora permite probar las teorías propuestas por los químicos de enzimas. Observaciones que sólo hace medio siglo no tenían explicación, ahora se comprenden en su totalidad.

Los mecanismos de muchas enzimas están bien establecidos y dan un cuadro general del funcionamiento de las enzimas como catalizadores. Se comenzará este capítulo con un repaso de los mecanismos químicos sencillos, y se seguirá con una breve descripción de la catálisis. A continuación se examinarán los modos principales de catálisis enzimática—catálisis ácido-base y covalente (clasificadas como efectos químicos), así como el enlace con el sustrato y la estabilización del estado de transición (clasificados como efectos de enlace).

6.1 Terminología de la química mecanicista

El mecanismo de una reacción es una descripción detallada de los eventos moleculares, atómicos e incluso subatómicos que suceden durante la reacción. Deben identificarse los reactivos, los productos y todos los compuestos intermedios. Para determinar el mecanismo de una reacción se usan varias técnicas de laboratorio. Por ejemplo, al utilizar reactivos marcados con isótopos se puede seguir la trayectoria de los átomos individuales.

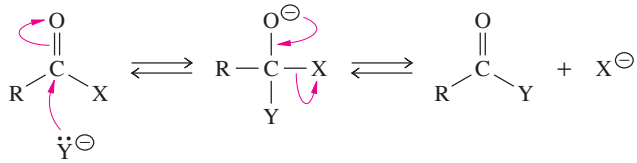
Arriba: Un paso del mecanismo de ruptura de un enlace peptídico catalizado por quimotripsina.

Con técnicas cinéticas se pueden medir los cambios de enlaces químicos de un reactivo o solvente durante la reacción. El estudio de cambios estereoquímicos que suceden durante la reacción puede producir una perspectiva tridimensional del proceso. Para cualquier mecanismo enzimático propuesto, debe coordinarse la información mecanicista de los reactivos y productos intermedios, con la estructura tridimensional de la enzima.

Los mecanismos enzimáticos se representan con el mismo simbolismo que el usado en química orgánica para representar la ruptura y la formación de enlaces químicos. El movimiento de los electrones es la clave para comprender las reacciones químicas (y enzimáticas). En esta sección se revisarán los mecanismos químicos, y en las siguientes se hablará de la catálisis y se presentarán varios mecanismos enzimáticos específicos. Esta descripción debe proporcionar antecedentes suficientes para que el lector comprenda todas las reacciones catalizadas por enzimas que se presentan en este libro.

A. Sustituciones nucleofílicas

Muchas reacciones químicas tienen compuestos intermedios iónicos. Hay dos tipos de intermedios iónicos: unas especies son ricas en electrones o **nucleofílicas,** y otras especies son pobres en electrones, o **electrofílicas** (sección 2.6). Un nucleófilo tiene una carga negativa o un par de electrones no compartido. Suele imaginarse que el nucleófilo ataca al electrófilo, y al mecanismo se le llama ataque nucleofílico, o sustitución nucleofílica. En la química mecanicista, el movimiento de un *par* de electrones se representa con una flecha curva que apunta desde los electrones disponibles en el nucleófilo hacia el centro electrofílico. Estos diagramas de "empuje de electrones" representan la ruptura de un enlace covalente existente, o la formación de un nuevo enlace covalente. En general, el mecanismo de una reacción implica un compuesto intermedio. Por ejemplo, la transferencia de un grupo acilo se puede representar con el mecanismo general siguiente:

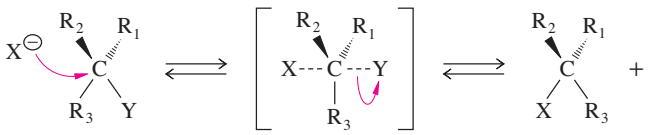


(6.1)

En este caso, el nucleófilo $Y^{\ominus}$ ataca al carbono carbonilo (es decir, se adiciona al átomo de carbono del grupo carbonilo) para formar un intermedio tetraédrico de adición, del cual $X^{\ominus}$, llamado grupo saliente (el grupo que desplaza el nucleófilo atacante) se elimina. Este es un ejemplo de una reacción de **sustitución nucleofílica**; se verá que las serina proteasas usan este mecanismo (sección 6.7).

Otro tipo de sustitución nucleofílica consiste en el desplazamiento directo. En este mecanismo, el grupo o molécula atacante se adiciona a la cara del átomo central, opuesto al grupo saliente, y forma un estado de transición que tiene cinco grupos asociados al átomo central. Este **estado de transición** es inestable y de gran energía. Tiene una estructura entre la del reactivo y la del producto. (Los estados de transición se encierran entre corchetes, para indicar que son entidades inestables y transitorias).

Los estados de transición se describirán más en la sección 6.2.



(6.2)

Estado de transición

Nótese que ambos tipos de mecanismos de sustitución nucleofílica tienen un estado de transición. En el primer tipo (reacción 6.1), la reacción procede en forma escalonada, formándose una molécula intermedia que puede tener la estabilidad suficiente para ser detectada. En el segundo tipo de mecanismo (reacción 6.2), la adición del nucleófilo atacante y el desplazamiento del grupo saliente ocurren en forma simultánea. El estado de transición no es un compuesto intermedio estable.

B. Reacciones de ruptura

También se encuentran reacciones de escisión o ruptura. Los enlaces covalentes se pueden romper de dos maneras: dos electrones permanecen con un átomo, o un electrón puede permanecer con cada átomo enlazado. En la mayor parte de las reacciones, ambos electrones están en un átomo, por lo que se forman un intermedio iónico y un grupo saliente. Por ejemplo, la ruptura de un enlace C—H casi siempre produce dos iones. Si el átomo de carbono retiene ambos electrones, el compuesto que lo contiene se transforma en un **carbanión**.

$$R_3—C—H \longrightarrow \underset{\text{Carbanión}}{R_3—C:^{\ominus}} + \underset{\text{Protón}}{H^{\oplus}} \qquad \textbf{(6.3)}$$

Si el átomo de carbono pierde ambos electrones, el compuesto que lo contiene se transforma en un ion catiónico llamado **carbocatión**.

$$R_3—C—H \longrightarrow \underset{\text{Carbocatión}}{R_3—C^{\oplus}} + \underset{\text{Ion hidruro}}{H^{\ominus}} \qquad \textbf{(6.4)}$$

En el segundo tipo de ruptura de enlace, menos común, un electrón se queda con cada producto, y se forman dos radicales libres que suelen ser muy inestables. (Un **radical libre**, o radical simplemente, es una molécula o átomo con un electrón no apareado).

$$R_1O—OR_2 \longrightarrow R_1O\cdot + \cdot OR_2 \qquad \textbf{(6.5)}$$

C. Reacciones de oxido-reducción

Las reacciones de oxido-reducción son fundamentales en el suministro de energía biológica. En una reacción de oxido-reducción (o reacción redox), los electrones de una especie se transfieren a otra. Aquí la terminología puede ser bastante confusa, por lo que es importante dominar el significado de las palabras *oxidación* y *reducción*, pues aparecerán en forma repetitiva en el resto del libro. **Oxidación** es la pérdida de electrones: una sustancia que es oxidada tendrá menos electrones cuando se termine la reacción. La **reducción** es la ganancia de electrones: una sustancia que gana electrones en una reacción es reducida. Las reacciones de oxidación y reducción siempre suceden en forma simultánea. Un sustrato es oxidado y el otro es reducido. Un agente oxidante es una sustancia que produce una oxidación: toma electrones del sustrato que es oxidado. Así, los agentes oxidantes ganan electrones (es decir, se reducen). Un agente reductor es una sustancia que dona o cede electrones (y en el proceso se oxida).

Pérdida de **El**ectrones = **O**xidación (PELO)
Ganancia de **E**lectrones = **R**educción(GER)

Recuerde la palabra: PELO

Oxidación es **Pér**dida (OPERA)
Reducción **e**s **Ga**nancia (REGA)

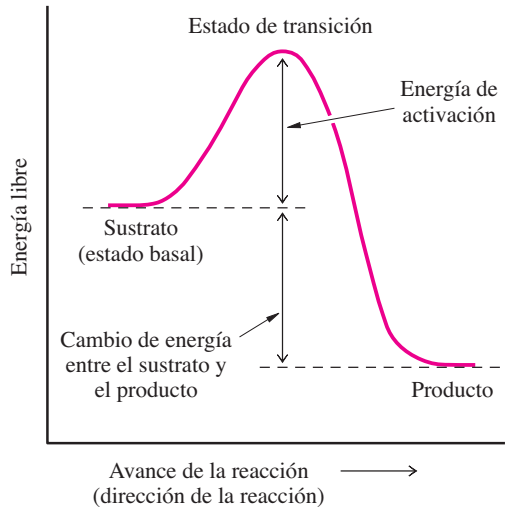
Recuerde la frase: ÓPERA REGA

Las oxidaciones pueden asumir varias formas, como la eliminación de hidrógeno (deshidrogenación), adición de oxígeno o eliminación de electrones. La deshidrogenación es la forma más común de oxidación biológica. Recuerde que las oxidorreductasas (enzimas que catalizan reacciones de oxido-reducción) representan una clase extensa de enzimas, y las deshidrogenasas (enzimas que catalizan la eliminación de hidrógeno) son una de las subclases principales de las oxidorreductasas (sección 5.1).

La mayor parte de las deshidrogenaciones suceden por ruptura del enlace C—H, produciendo un ion hidruro ($H^{\ominus}$). El sustrato es oxidado porque pierde los electrones asociados con el ion hidruro. Esas reacciones se acompañarán por una reducción correspondiente, en la que otro sustrato gana electrones al reaccionar con el ion hidruro. La deshidrogenación del lactato (reacción 5.1) es un ejemplo de la eliminación de hidrógeno. En este caso, la oxidación de lactato está acoplada con la reducción de la coenzima $NAD^{\oplus}$. El papel de los cofactores en las reacciones de oxido-reducción se describirá en el siguiente capítulo (sección 7.3).

6.2 Estabilización de estados de transición mediante catalizadores

Para comprender la catálisis es necesario apreciar la importancia de los estados de transición y los compuestos intermedios en las reacciones químicas. La velocidad de una



◀ Figura 6.1
Diagrama de energía para una reacción en un solo paso. La flecha superior indica la energía de activación de la reacción directa o de avance. Las moléculas del sustrato que tienen más energía libre que la energía de activación pasan sobre la barrera de activación, y se convierten en moléculas del producto. Para reacciones que tienen una alta barrera de activación, debe suministrarse energía en forma de calor, para que se efectúe la reacción.

reacción química depende de la frecuencia con que chocan las moléculas reaccionantes, de tal forma que se favorezca la reacción. Para que los choques resulten en un producto, las sustancias que colisionen deben tener la orientación correcta, y deben poseer la energía suficiente para acercarse a la configuración física de los átomos y enlaces del producto. El estado de transición es un arreglo inestable de átomos en el que los enlaces químicos están en proceso de formación o de ruptura. Los estados de transición tienen tiempos de vida extremadamente cortos (de unos 10^{-14} a 10^{-13} segundos, que es el tiempo de una vibración de enlace). Aunque todavía no se pueden detectar experimentalmente, se pueden pronosticar sus estructuras. La energía que se requiere para llegar al estado de transición a partir del estado basal de los reactivos se llama energía de activación de la reacción, y con frecuencia se le llama barrera de activación.

El progreso de una reacción se puede representar con un diagrama de energía o perfil de energía. La figura 6.1 es un ejemplo que muestra la conversión de un sustrato (reactivo) en un producto en un solo paso. El eje *y* indica las energías libres de las especies reaccionantes. El eje *x* se llama coordenada de reacción y representa el progreso de la reacción a partir del sustrato a la izquierda, y avanzando hacia el producto a la derecha. Este eje no es de tiempo, sino más bien del progreso de rupturas y formaciones de enlaces en determinada molécula. El estado de transición ocurre en el máximo de la barrera de activación. Es la cantidad de energía que debe superarse para que se efectúe la reacción. Cuanto más baja sea la barrera, el estado de transición es más estable y la reacción se efectúa con más frecuencia.

Los compuestos intermedios, a diferencia de los estados de transición, pueden tener la estabilidad suficiente para poder detectarse o aislarse. Cuando hay un compuesto intermedio en una reacción, el diagrama de energía tiene una depresión que representa la energía libre del intermedio (figura 6.2). Esta reacción tiene dos estados de transición, uno anterior a la formación del intermedio y el otro preliminar a su conversión en producto. El paso más lento, que determina la velocidad, es el paso que tiene el estado de transición de mayor energía. En la figura 6.2, el paso determinante de la velocidad es la formación del compuesto intermedio. Como se requiere una energía relativamente pequeña para que el compuesto intermedio continúe hacia el producto o regrese al reactivo original, el compuesto intermedio es metaestable. Los compuestos intermedios propuestos que son de vida corta para poder aislarlos o detectarlos, con frecuencia se encierra entre corchetes como si fueran estados de transición, a los cuales es probable que se parezcan.

Los catalizadores crean rutas de reacción que tienen menores energías de activación que las de las reacciones no catalizadas. Los catalizadores participan directamente en las reacciones porque estabilizan los estados de transición que hay en las rutas de reacción. Las enzimas son catalizadores que aceleran las reacciones porque disminuyen la energía total de activación. Causan aumento de velocidad al formar una ruta de varios pasos (con uno o varios compuestos intermedios) en el que cada uno de los pasos tiene menor energía de activación que los estados correspondientes en la reacción no enzimática.

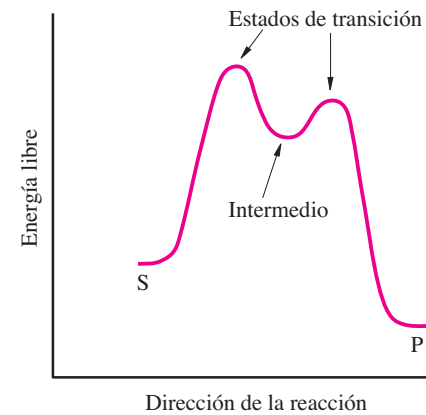


Figura 6.2 ▲
Diagrama de energía para una reacción que tiene un compuesto intermedio. Este compuesto intermedio está en el mínimo entre los dos estados de transición. El paso que determina la velocidad en dirección de avance es la formación del primer estado de transición, que es el que tiene mayor energía de transición. S representa al sustrato y P representa al producto.

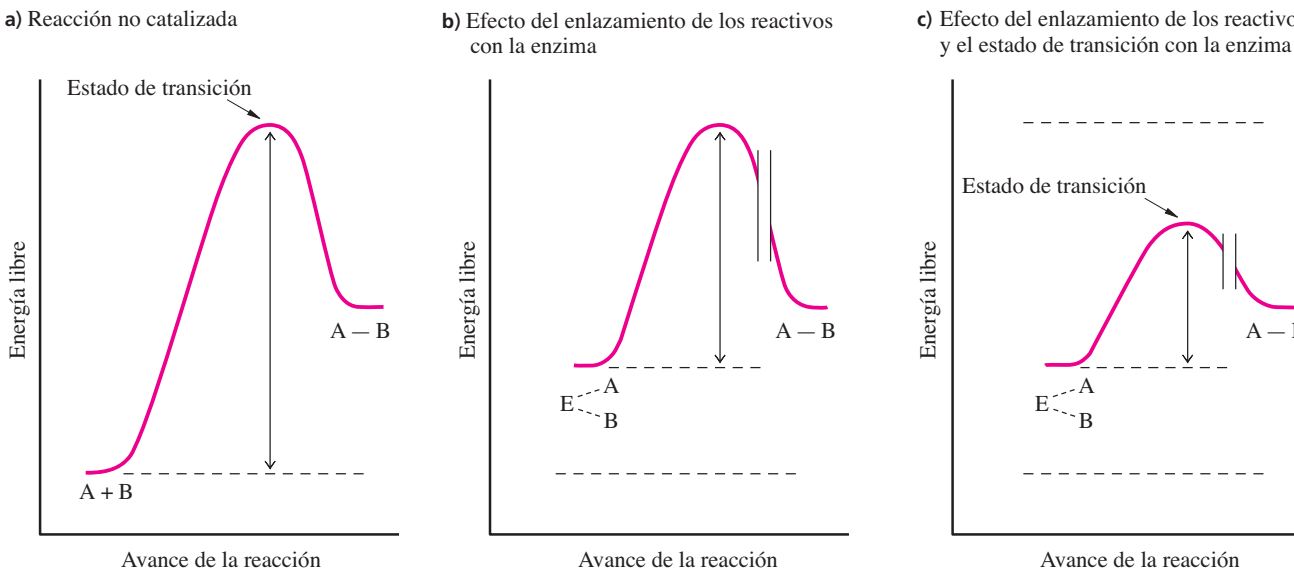


Figura 6.3 ▲
Catálisis enzimática de la reacción A + B → A – B **a)** Diagrama de energía para la reacción no catalizada. **b)** Efecto del enlace del reactivo. El agrupamiento de los dos reactivos en el complejo EAB los ubica en forma adecuada para la reacción, hace que sea más frecuente la formación del estado de transición, y en consecuencia disminuye la energía de activación. **c)** Efecto de la estabilización del estado de transición. Una enzima se une al estado de transición con más fuerza que a los sustratos, bajando más la energía de activación. Así, una reacción enzimática tiene una energía de activación mucho menor que una reacción no catalizada. (Las discontinuidades en las curvas de reacción indican que las enzimas producen rutas de varios pasos).

El primer paso en una reacción enzimática es la formación de un complejo no covalente de enzima y sustrato, ES. Cuando los reactivos se enlazan con las enzimas pierden mucha entropía. En una reacción entre A y B, la formación del complejo EAB reúne y ubica a los reactivos haciendo que la probabilidad de la reacción catalizada por la enzima sea mucho mayor que la no catalizada. Las figuras 6.3a y 6.3b muestran un caso hipotético, en el que la unión con el sustrato es el único modo de catálisis por parte de una enzima. En este ejemplo, la energía de activación disminuye al juntar los reactivos en el sitio de unión del sustrato. Una unión correcta con el sustrato explica gran parte del poder catalítico de las enzimas.

Los sitios activos de las enzimas enlazan sustratos y productos. También se unen a estados de transición. De hecho, es probable que los estados de transición se unan a sitios activos con mucha más fuerza de lo que lo hacen los sustratos. Las interacciones adicionales de enlazamiento estabilizan al estado de transición y bajan todavía más la energía de activación (figura 6.3c). Se verá que la unión de sustratos, seguida por la unión de estados de transición, permite tener el máximo aumento de velocidad en la catálisis enzimática. Se regresará a los fenómenos de enlazamiento más adelante en este capítulo, después de examinar los procesos químicos sobre los que se basa la función enzimática. (Nótese que las reacciones catalizadas por enzimas suelen ser reversibles. Los mismos principios se aplican a las reacciones inversas. La energía de activación disminuye por unión de los "productos" y estabilización del estado de transición).

6.3 Modos químicos de la catálisis enzimática

Además de los residuos reactivos de aminoácido, puede haber iones metálicos o coenzimas en el sitio activo. El papel de esos cofactores en la catálisis enzimática se describe en el capítulo 7

La formación de un complejo ES coloca a los reactivos en la cercanía de residuos de aminoácidos del sitio activo de la enzima. Las cadenas laterales ionizables participan en dos clases de catálisis química: catálisis ácido-base y catálisis covalente. Son los dos modos químicos principales de catálisis.

RECUADRO 6.1 Modificación de enzimas por mutagénesis dirigida al sitio

Las funciones de las cadenas laterales de aminoácido en una enzima se pueden probar usando la técnica de **mutagénesis dirigida al sitio** (vea la sección 23.10). La mutagénesis es un método para producir enzimas con distintos residuos de aminoácido. Es más específica que la inhibición irreversible tradicional, y también permite probar aminoácidos para los que no hay inhibidores químicos específicos. En este procedimiento, se reemplaza en forma específica un aminoácido por otro, a través de la biosíntesis de una enzima modificada. Para comenzar, se aísla el gen que codifica la enzima, se secuencia y se inserta en un vector adecuado que se usa para transformar bacterias. Entonces puede sintetizarse la enzima en las células bacterianas transformadas. Después de verificar que las bacterias sintetizan la enzima no modificada (tipo silvestre), se repite el experimento usando ADN que se ha mutado *in vitro* en sitios específicos. Las bacterias sintetizan la proteína mutante, que entonces se aísla y se analiza su actividad enzimática.

Un buen ejemplo de la mutagénesis dirigida al sitio es la alteración de la peptidasa subtilisina de *Bacillus subtilis* para hacerla más resistente a la oxidación química. Se agrega subtilisina a polvos de detergente para ayudar a quitar manchas de proteína, como de chocolate o sangre. Tiene un residuo de metionina en la hendidura del sitio activo (Met-222) que se oxida con facilidad y causa la inactivación de la enzima. Una resistencia a la oxidación aumentaría la actividad de la subtilisina como aditivo del detergente. En una serie de experimentos mutagénicos se reemplazó en forma sistemática la Met-222 por cada uno de los demás aminoácidos comunes. Se aislaron todas las 19 subtilisinas mutantes posibles y se probaron; la mayor parte tuvo una actividad muy disminuida de peptidasa. El mutante Cis-222 tuvo gran actividad, pero también estaba sujeto a la oxidación. Los mutantes Ala-222 y Ser-222, con cadenas laterales no oxidables, tuvieron una actividad relativamente alta. Fueron las únicas variantes activas de subtilisina mutante estables al oxígeno.

La mutagénesis dirigida al sitio se ha hecho para alterar ocho de los 319 residuos de aminoácido de una proteasa bacteriana. La proteasa de tipo silvestre es moderadamente estable cuando se calienta, pero la enzima mutada en forma adecuada es estable, y puede funcionar a 100°C. Se evita su desnaturalización con grupos como un puente de disulfuro, que estabilicen su conformación. Experimentos de este tipo podrán permitir la producción de enzimas que puedan almacenarse a temperatura ambiente durante largo tiempo. Las conclusiones de los estudios de sitios activos mediante mutagénesis dirigida al sitio se describen en todo este libro.

A. Residuos polares de aminoácidos en sitios activos

La cavidad del sitio activo en una enzima en general está cubierta con residuos hidrofóbicos de aminoácidos. Sin embargo, también en el sitio activo hay unos pocos residuos polares, ionizables (con algunas moléculas de agua). Los residuos polares de aminoácidos (o a veces coenzimas) tienen cambios químicos durante la catálisis enzimática. Esos residuos forman gran parte del centro catalítico de la enzima.

La tabla 6.1 muestra una lista de los residuos ionizables encontrados en los sitios activos de las enzimas. La histidina, cuyo pK_a aproximado es de 6 a 7 en las proteínas, es con frecuencia un aceptor o un donador de protones. El aspartato, el glutamato y a veces la lisina también pueden participar en la transferencia de un protón. Ciertos aminoácidos, como la serina y la cisteína, intervienen con frecuencia en reacciones de transferencia de un grupo. A pH neutro, el aspartato y el glutamato suelen tener cargas negativas, y la

TABLA 6.1 Funciones catalíticas de grupos reactivos en aminoácidos ionizables

Aminoácido	Grupo reactivo	Carga neta a pH 7	Funciones principales
Aspartato	—$COO^{\ominus}$	—1	Unión con cationes; transferencia de protón
Glutamato	—$COO^{\ominus}$	—1	Unión con cationes; transferencia de protón
Histidina	Imidazol	Casi 0	Transferencia de protón
Cisteína	—CH_2SH	Casi 0	Unión covalente de grupos acilo
Tirosina	Fenol	0	Puente de hidrógeno a ligandos
Lisina	$NH_3^{\oplus}$	+1	Unión con aniones; transferencia de protón
Arginina	Guanidinio	+1	Unión con aniones
Serina	—CH_2OH	0	Unión covalente de grupos acilo

TABLA 6.2 Valores típicos de pK_a para grupos ionizables de aminoácidos en proteínas

Grupo	p*K*a
α-Carboxilo terminal	3–4
Carboxilo en cadena lateral	4–5
Imidazol	6–7
α-Amino terminal	7.5–9
Tiol	8–9.5
Fenol	9.5–10
ε-Amino	~10
Guanidina	~12
Hidroximetilo	~16

TABLA 6.3 Distribución de frecuencias de residuos catalíticos en enzimas

	% de residuos catalíticos	% de todos los residuos
His	18	3
Asp	15	6
Arg	11	5
Glu	11	6
Lys	9	6
Cys	6	1
Tyr	6	4
Asn	5	4
Ser	4	5
Gly	4	8

lisina y la arginina tienen cargas positivas. Estos aniones y cationes pueden actuar como sitios para enlazamiento electrostático de grupos o sustratos con carga opuesta.

Como se describió en la sección 3.4, los valores de pK_a de los grupos ionizables de residuos de aminoácido en las proteínas pueden diferir de los valores para los mismos grupos en los aminoácidos libres. La tabla 6.2 muestra una lista de valores típicos de pK_a para grupos ionizables de residuos de aminoácidos en proteínas. Compárense estos valores con los valores exactos para los aminoácidos libres de la tabla 3.2. Determinado grupo ionizable puede tener distintos valores de pK_a en una proteína, debido a la diferencia de microambientes. Estas diferencias suelen ser pequeñas, pero pueden ser importantes.

En ocasiones, la cadena lateral de un residuo de aminoácido catalítico tiene un pK_a muy diferente del que aparece en la tabla 6.2. Teniendo en cuenta que pueden perturbarse los valores de pK_a, se puede investigar si determinados aminoácidos participan en una reacción, examinando el efecto del pH sobre la velocidad de reacción. Si el cambio de velocidad se correlaciona con el pK_a de cierto aminoácido iónico (sección 6.3D), puede ser que un residuo de ese aminoácido participe en la catálisis.

Sólo una cantidad pequeña de residuos de aminoácido participa en forma directa para catalizar reacciones. La mayor parte de los residuos contribuyen en forma indirecta, ayudando a mantener la estructura tridimensional correcta de una proteína. Como se vio en el capítulo 4, la mayor parte de los residuos de aminoácido no se han conservado en forma evolutiva.

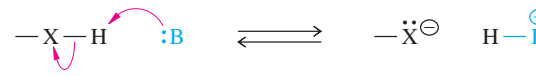
Los estudios de mutagénesis *in vitro* de las enzimas han confirmado que la mayor parte de las sustituciones de aminoácido tiene poco efecto sobre la actividad enzimática. Sin embargo, toda enzima tiene unos pocos residuos clave que son absolutamente esenciales para la catálisis. Algunos de estos residuos participan en forma directa en el mecanismo catalítico, con frecuencia actuando como catalizador ácido o base, o como un nucleófilo. Otros residuos actúan en forma indirecta para ayudar o intensificar el papel de un residuo clave. Otras funciones de los residuos catalíticos clave son el enlazamiento con el sustrato, la estabilización del estado de transición y el interactuar con cofactores esenciales.

Las enzimas suelen tener de dos a seis residuos catalíticos esenciales. Los diez residuos catalíticos más importantes se muestran en la tabla 6.3. Los residuos con carga, His, Asp, Arg, Glu y Lys forman casi las dos terceras partes de todos los residuos catalíticos. Eso tiene más sentido, porque es más probable que las cadenas laterales con carga funcionen como ácidos, bases y nucleófilos. También es más probable que tengan un papel en el enlazamiento con el sustrato, o con estados de transición. La histidina es el residuo catalítico número uno. Es seis veces más probable que intervenga en la catálisis que lo que parecería indicar su abundancia en las proteínas.

B. Catálisis ácido-base

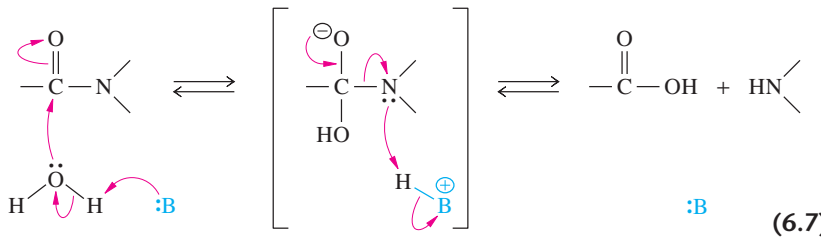
En la catálisis ácido-base, la aceleración de una reacción se debe a la transferencia catalítica de un protón. Esta catálisis ácido-base es la forma más común de catálisis en química orgánica, y también es común en las reacciones enzimáticas. Las enzimas que la hacen se basan en cadenas laterales de aminoácido que pueden donar y aceptar protones en las condiciones de pH neutro de las células. Este tipo de catálisis ácido-base, donde intervienen agentes de transferencia de protones, se llama catálisis ácido-base general. (La catálisis por $H^{\oplus}$ u $OH^{\ominus}$ se llama catálisis ácida específica, o catálisis básica específica). De hecho, los sitios activos de estas enzimas son el equivalente biológico de una solución de ácido o base.

Conviene usar B: para representar a una base o aceptador de protón, y $BH^{\oplus}$ para representar su ácido conjugado, un donador de protón. (Este par ácido-base también puede escribirse en la forma HA/$A^{\ominus}$). Un aceptor de protón puede ayudar a las reacciones en dos formas. Puede romper los enlaces O—H, N—H, incluso algunos C—H, quitando a un protón.



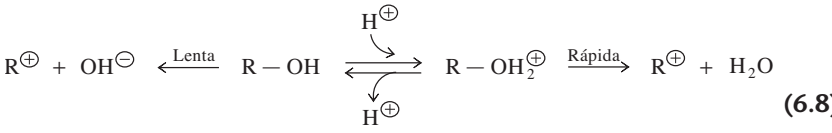
(6.6)

También la base general B: puede participar en la ruptura de otros enlaces donde interviene el carbono, como un enlace C—N, al generar un equivalente de $OH^{\ominus}$ en solución neutra mediante la eliminación de un protón de una molécula de agua.



(6.7)

El ácido general $BH^{\oplus}$ también puede ayudar en la ruptura de enlaces. Un enlace covalente puede romperse con facilidad si se protona uno de sus átomos. Por ejemplo,



(6.8)

Por consiguiente, $BH^{\oplus}$ puede catalizar la ruptura de un enlace donando un protón a un átomo (como el de oxígeno en el R—OH en la reacción 6.8), y con ello hace que sean más lábiles los enlaces de ese átomo. En todas las reacciones donde interviene $BH^{\oplus}$, la reacción inversa es catalizada por B:, y viceversa.

Como el grupo imidazol/imidazolio de la cadena lateral de la histidina tiene un pK_a aproximado entre 6 y 7 en la mayor parte de las proteínas, es un grupo ideal para transferencia de un protón a valores de pH neutro. Hemos visto que la histidina es un residuo catalítico común. En las secciones que siguen examinaremos algunos papeles específicos de las cadenas laterales de la histidina.

C. Catálisis covalente

En la catálisis covalente se une un sustrato en forma covalente a la enzima y se forma un compuesto intermedio reactivo. La cadena lateral que reacciona de la enzima puede ser un nucleófilo o un electrófilo. La catálisis nucleofílica es más común. En el segundo paso de la reacción se transfiere una porción del sustrato del compuesto intermedio a un segundo sustrato. Por ejemplo, el grupo X puede transferirse de la molécula A—X a la molécula B por los dos pasos siguientes mediante el complejo ES covalente X—E:

$$A—X + E \rightleftharpoons X—E + A \qquad \textbf{(6.9)}$$

y

$$X—E + B \rightleftharpoons B—X + E \qquad \textbf{(6.10)}$$

Este es un mecanismo común en bioquímica para acoplar dos reacciones diferentes. Recuérdese que la capacidad de acoplar reacciones es una de las propiedades importantes de las enzimas (página 130). La reacción catalizada por la sacarosa fosforilasa bacteriana es un ejemplo de transferencia de grupo mediante catálisis covalente. (La sacarosa está formada por un residuo de glucosa y un residuo de fructosa).

$$\text{Sacarosa} + P_i \rightleftharpoons \text{1-fosfato de glucosa} + \text{Fructosa} \qquad \textbf{(6.11)}$$

El primer paso químico en la reacción es la formación de un intermedio covalente de glucosilo-enzima. En este caso, la sacarosa equivale a A—X y la glucosa equivale a X, en la reacción 6.10.

$$\text{Sacarosa} + \text{Enzima} \rightleftharpoons \text{Glucosilo-enzima} + \text{Fructosa} \qquad \textbf{(6.12)}$$

El intermedio covalente ES puede donar la unidad de glucosa, a una u otra molécula de fructosa, en la inversa de la reacción 6.12, o a un fosfato (que equivale a B en la reacción 6.10).

$$\text{Glucosilo-enzima} + P_i \rightleftharpoons \text{Glucosa 1-fosfato} + \text{Enzima} \qquad \textbf{(6.13)}$$

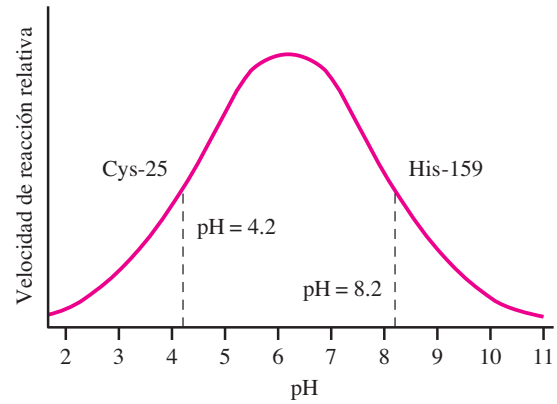
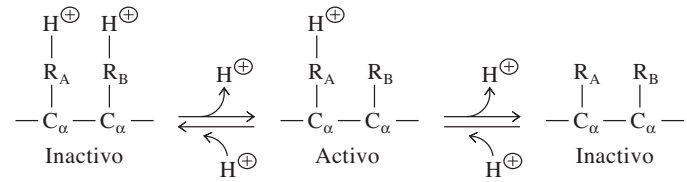


Figura 6.4▶
Perfil de pH-velocidad para la papaína. Los segmentos izquierdo y derecho de la curva en forma de campana representan las titulaciones de cadenas laterales de aminoácidos en el sitio activo. El punto de inflexión a pH 4.2 refleja el pK_a de Cys-25, y el punto de inflexión a pH 8.2 refleja el pK_a de His-159. La enzima sólo es activa cuando estos grupos iónicos existen como par de iones tiolato-imidazolio.

Al parecer, 20% de las enzimas emplean la catálisis covalente. Para demostrar que un mecanismo enzimático se basa en la catálisis covalente se requiere aislar o detectar el compuesto intermedio, y demostrar que tiene la reactividad suficiente. La observación de la cinética de ping-pong (sección 5.6) es otro indicador de catálisis covalente.

D. Influencia del pH sobre las velocidades de reacción enzimática

El efecto del pH sobre la velocidad de reacción de una enzima puede indicar cuáles residuos ionizables de aminoácido están en su sitio activo. La sensibilidad al pH suele reflejar una alteración en el estado de ionización de uno o más residuos que participan en la catálisis, aunque a veces se afecta la unión con el sustrato. Con mayor frecuencia, una gráfica de velocidad de reacción contra pH es una curva con forma de campana, siempre que la enzima no se desnaturalice cuando se altere el pH. Un buen ejemplo es el perfil de pH-velocidad para la papaína, una proteasa aislada del fruto de la papaya (figura 6.4). La curva acampanada de pH-velocidad se puede explicar suponiendo que la parte ascendente de la curva representa la desprotonación de un residuo de aminoácido en el sitio activo (B), y la parte descendente representa la desprotonación de un segundo residuo de aminoácido en el sitio activo (A). Los dos puntos de inflexión indican en forma aproximada los valores de pK_a de los dos residuos ionizables. Una curva en forma de campana simple es el resultado de dos titulaciones traslapadas. La cadena lateral de A (R_A) debe protonarse para tener actividad, y la cadena lateral de B (R_B) se debe desprotonar.



(6.14)

Cuando el pH es óptimo, a la mitad entre los dos valores de pK_a, la mayor cantidad de moléculas de enzima está en la forma activa, con el residuo A protonado. No todas las curvas de pH-velocidad son en forma de campana. Un perfil de pH-velocidad es una curva sigmoidal si sólo participa un residuo ionizable de aminoácido en la catálisis, y puede tener una forma más complicada si participan más de dos grupos. En forma rutinaria, se analizan las enzimas cerca de su valor óptimo de pH, que se mantiene mediante el uso de soluciones amortiguadoras adecuadas.

El perfil de pH-velocidad de la papaína, con puntos de inflexión en pH de 4.2 y 8.2, indica que la actividad de la papaína depende de dos residuos de aminoácido en el sitio activo, con valores aproximados de pK_a de 4 y 8. Estos residuos ionizables son una cisteína nucleofílica (Cys-25) y un grupo imidazolio donador de protones de histidina (His-159) (figura 6.5). La cadena lateral de la histidina suele tener un valor de pK_a entre 8 y 9.5. En el sitio activo de la papaína, el pK_a de Cys-25 se altera mucho, a 3.4. El pK_a del residuo de His-159 se perturba a 8.3. Los puntos de inflexión en el perfil de

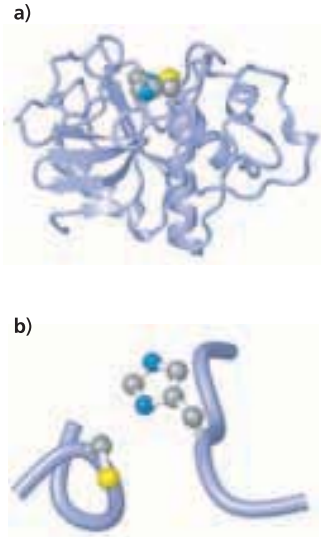


Figura 6.5▲
Residuos ionizables en la papaína. **a)** Modelo de la papaína, con modelos de esferas llenas para histidina y cisteína en el sitio activo. Los átomos de nitrógeno del imidazol están en azul y el átomo de azufre es amarillo. **b)** Estos dos residuos de sitio activo se unen a la columna vertebral de la proteína, que ha girado respecto de su posición en la parte (a). [PDB 1EFF]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

pH-velocidad no corresponden exactamente a los valores de pK_a de Cys-25 e His-159, porque la ionización de grupos adicionales contribuye poco a la forma general de la curva. En la figura 6.6 se ven tres formas iónicas del centro catalítico de la papaína. La enzima sólo es activa cuando los grupos tiolato e imidazolio forman un par de iones (como en el tautómero superior del par intermedio, en la figura 6.6).

6.4 Reacciones controladas por difusión

Unas pocas enzimas catalizan reacciones a velocidades que se aproximen al límite físico superior de las reacciones en solución. Este límite superior teórico es la velocidad de difusión de los reactivos cercanos uno a otro. Una reacción que se produce con cada choque entre moléculas de reactivos se llama reacción controlada por difusión. Bajo condiciones fisiológicas, se ha calculado que la velocidad controlada por difusiones es de 10^8 a 10^9 M^{-1} s^{-1}. La frecuencia de encuentros puede ser mayor si hay atracción electrostática entre los reactivos. Las constantes de velocidad aparentes de segundo orden (k_{cat}/K_m) para cinco enzimas muy rápidas se indican en la tabla 6.4.

La unión de un sustrato a una enzima es una reacción rápida. Si el resto de la reacción es sencillo y rápido, el paso de enlazamiento puede ser el paso que determine la velocidad, y la velocidad total de la reacción podrá acercarse al límite superior para la catálisis. Sólo hay pocos tipos de reacciones químicas que pueden avanzar tan rápido. Entre ellas están las reacciones de asociación, algunas transferencias de protones y transferencias de electrones. Las reacciones catalizadas por todas las enzimas de la tabla 6.4 son tan sencillas que los pasos que determinan la velocidad son aproximadamente tan rápidos como el enlazamiento de los sustratos con las enzimas. Ahora se verán con detalle dos de esas enzimas: triosa fosfato isomerasa y superóxido dismutasa.

A. Triosa fosfato isomerasa

La triosa fosfato isomerasa cataliza la interconversión rápida de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y el gliceraldehído 3-fosfato(G3P) en las rutas de la glicólisis y la gluconeogénesis (capítulos 11 y 12).

Dihidroxiacetona fosfato (DHAP) — D-gliceraldeído 3-fosfato (G3P) **(6.15)**

Un posible mecanismo se muestra en la figura 6.7 sobre la página siguiente. La reacción se efectúa desplazando protones del átomo de carbono 1 del DHAP al átomo de

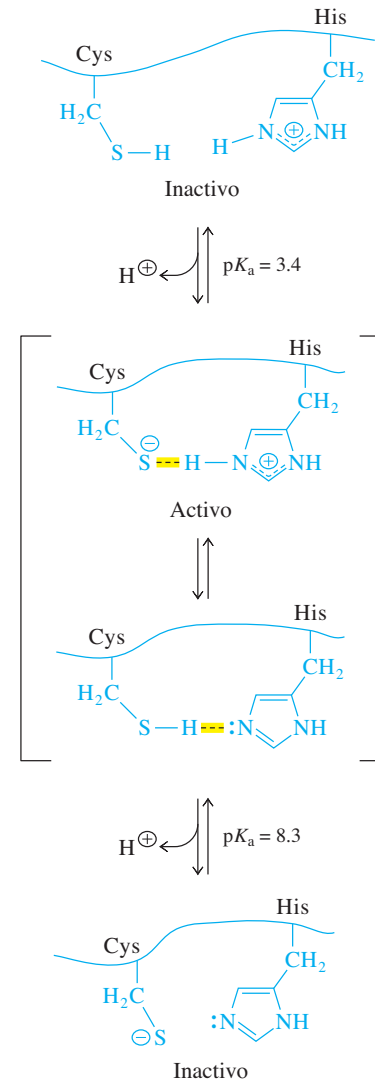


Figura 6.6 ▲
La actividad de la papaína depende de dos residuos ionizables, histidina (His-159) y cysteína (Cys-25) en el sitio activo. Se muestran tres formas iónicas de estos residuos. Sólo el tautómero superior del par intermedio es activo.

TABLA 6.4 Enzimas con constantes de velocidad de segundo orden cercanas al límite superior

Enzima	Sustrato	k_{cat}/K_m (M^{-1} s^{-1})*
Catalasa	H_2O_2	4×10^7
Acetilcolinesterasa	Acetilcolina	2×10^8
Triosa fosfato isomerasa	D-Gliceraldehido-3-fosfato	4×10^8
Fumarasa	Fumarato	10^9
Superóxido dismutasa	$\cdot O_2^{\ominus}$	2×10^9

* La proporción k_{cat}/K_m es la aparente constante de velocidad de segundo orden para la reacción catalizada por la enzima E + S → E + P. Para estas enzimas, la formación del complejo ES puede ser el paso más lento.

Cuando la dihidroxiacetona fosfato se une, el oxígeno del carbonilo forma un puente de hidrógeno con el grupo imidazol neutro de la His-95. El grupo carboxilato de la Glu-165 remueve un protón del C-1 del sustrato para formar un enodiolato intermedio.

El residuo His-95 forma un puente de hidrógeno fuerte con el átomo de oxígeno en el C-2 del enodiolato y protona a este átomo de oxígeno.

A continuación, la forma imidazolato de la His-95 toma un protón del grupo hidroxilo en C-1 e intercambia el protón entre los átomos de oxígeno, produciendo otro enodiolato intermedio inestable.

La Glu-165 dona un protón al C-2 y produce D-gliceraldehído 3-fosfato.

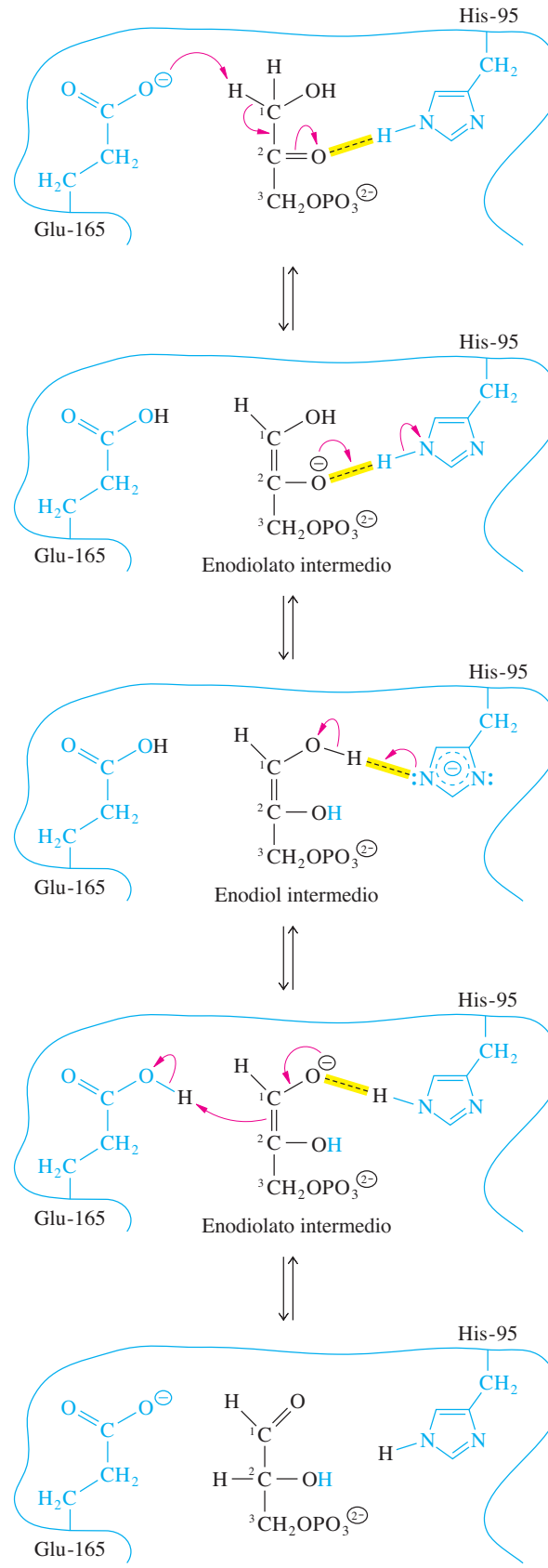
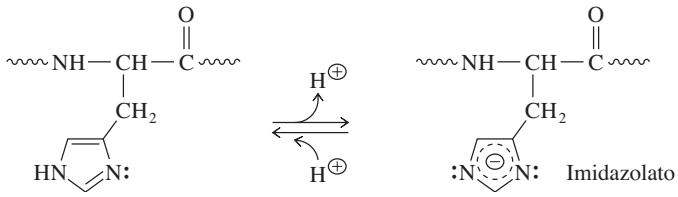


Figura 6.7 ▲
Mecanismo general ácido-base propuesto para la reacción catalizada por la triosa fosfato isomerasa.

carbono 2. La triosa fosfato isomerasa tiene dos residuos ionizables en el sitio activo: glutamato, que funciona como catalizador ácido-base general, e histidina, que forma un puente entre un protón y átomos de oxígeno de un compuesto intermedio unido a la enzima (figura 6.8). En la conversión de la dihidroxiacetona fosfato a gliceraldehído 3-fosfato, la forma de la histidina donadora de protones parece ser la especie neutra, y la especie aceptadora del protón parece ser el imidazolato. Los puentes de hidrógeno formados entre la histidina y los compuestos intermedios en este mecanismo parecen ser inusualmente fuertes. (Se ha propuesto un mecanismo alterno en el que la Glu-165 transfiere protones no sólo entre C-1 y C-2, sino también entre los átomos de oxígeno unidos al C-1 y al C-2. También participan en este mecanismo puentes de hidrógeno fuertes).



(6.16)

La forma imidazolato de un residuo de histidina es poco frecuente; el mecanismo con triosa fosfato isomerasa fue el primer mecanismo enzimático en el que fue implicada esta forma.

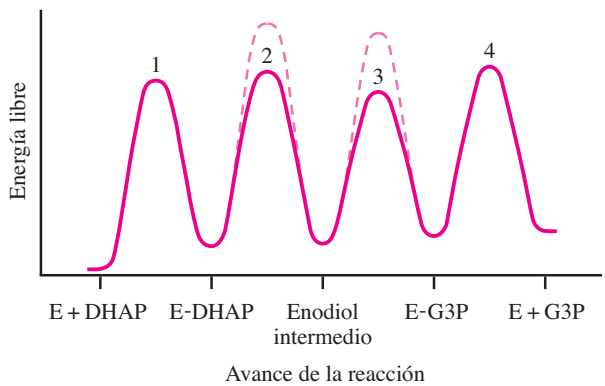
A mediados de la década de 1970, Jeremy Knowles y sus colaboradores determinaron las constantes de velocidad de los cuatro pasos enzimáticos, cinéticamente medibles en ambas direcciones.

$$\text{E} + \text{DHAP} \underset{}{\overset{(1)}{\rightleftharpoons}} \text{E-DHAP} \overset{(2)}{\rightleftharpoons} \text{E-Intermedio} \overset{(3)}{\rightleftharpoons}$$

$$\text{E-G3P} \overset{(4)}{\rightleftharpoons} \text{E} + \text{G3P} \qquad \textbf{(6.17)}$$

El diagrama de energía trazado con estas constantes de velocidad se ve en la figura 6.9, junto con el diagrama de energía de una triosa fosfato isomerasa mutante (líneas interrumpidas) que se describirá más adelante. Nótese que todas las barreras para la enzima no mutante tienen más o menos la misma altura. Eso quiere decir que los pasos están balanceados, y que no hay uno que sea determinante de la velocidad. El paso físico de unión de S con E es rápido, pero no mucho más que los pasos químicos posteriores en la secuencia de la reacción. El valor de la constante de velocidad de segundo orden, k_{cat}/K_m, para la conversión de gliceraldehído 3-fosfato a dihidroxiacetona fosfato es de $4 \times 10^8\ M^{-1}\ s^{-1}$, cercano a la velocidad teórica de una reacción controlada por difusión. Al parecer, esta isomerasa ha evolucionado para alcanzar su eficiencia máxima posible como catalizador.

Knowles y sus colegas convirtieron el residuo de glutamato en el sitio activo (Glu-165) de la triosa fosfato isomerasa en un residuo de aspartato por mutagénesis dirigida al sitio. Este residuo de aspartato de la isomerasa modificada tiene el mismo grupo reactivo (—$COO^{\ominus}$) que el residuo de glutamato de la enzima tipo silvestre (encontrada en forma natural), pero está un poco más alejado del sustrato. Las enzimas de tipo



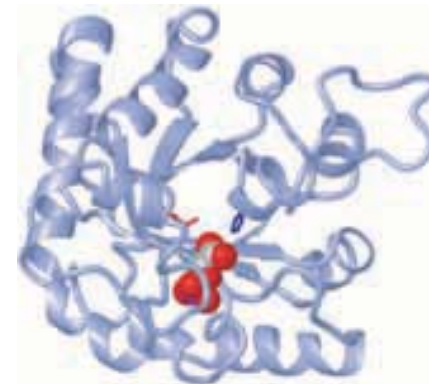


Figura 6.8 ▲
Estructura de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), una triosa fosfato isomerasa. La localización del sustrato se indica por el modelo de llenado del estado de transición análogo. Las cadenas laterales de los residuos catalíticos se representan mediante modelos en rama: Glu-165 (gris oscuro), His-95 (gris claro) [PDB 2YPI].

◀ Figura 6.9
Diagrama de energía para la reacción catalizada por triosa fosfato isomerasa. La línea llena es el perfil de la enzima tipo silvestre (que se encuentra en forma natural). La línea de puntos es el perfil de una enzima mutante en la que el residuo glutamato en el sitio activo se ha sustituido por un residuo de aspartato. En la enzima mutante, las energías de activación para las reacciones de transferencia de protón (pasos 2 y 3 en la ecuación 6.17) son significativamente mayores. [Adaptado de Raines, R. T., Sutton, E. L., Strauss, D. R., Gilbert, W. y Knowles, J. R. (1986). Reaction energetics of a mutant triose phosphate isomerase in which the active-site glutamate has been changed to aspartate. *Biochemistry* 25:7142-7154].

silvestre y las mutadas tienen valores parecidos de K_m, pero el valor de k_{cat} de la enzima mutada disminuye mucho. La enzima mutada es unas 1,000 veces más lenta que la normal. Este experimento demostró que el residuo de glutamato en el sitio activo es esencial para que la actividad sea completa. La sustitución de glutamato por aspartato también cambió una enzima controlada por difusión a una enzima más típica, que tiene un enlazamiento rápido de reactivos y pasos más lentos de catálisis química.

B. Superóxido dismutasa

La superóxido dismutasa es un catalizador todavía más rápido que la triosa fosfato isomerasa. La superóxido dismutasa cataliza la eliminación, muy rápida, del radical anión superóxido, $\cdot O_2^{\ominus}$, que es un subproducto del metabolismo oxidante. La enzima cataliza la conversión de superóxido en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno, el cual se elimina con rapidez por la acción subsecuente de enzimas, como la catalasa.

$$4\,\cdot O_2^{\ominus} \xrightarrow[\text{Superóxido dismutasa}]{4\,H^{\oplus}\ \ 2\,O_2} 2\,H_2O_2 \xrightarrow[\text{Catalasa}]{} 2\,H_2O + O_2 \qquad \textbf{(6.18)}$$

La reacción catalizada por la superóxido dismutasa se efectúa en dos pasos, durante los que un átomo de cobre unido a la enzima se reduce y después se oxida.

$$\text{E-Cu}^{2+} + \cdot O_2^{\ominus} \longrightarrow \text{E-Cu}^{\oplus} + O_2 \qquad \textbf{(6.19)}$$

$$\text{E-Cu}^{\oplus} + \cdot O_2^{\ominus} + 2H^{\oplus} \longrightarrow \text{E-Cu}^{2+} + H_2O_2 \qquad \textbf{(6.20)}$$

La reacción total incluye la unión de las moléculas aniónicas de sustrato, la transferencia de electrones y protones, y la liberación de los productos sin carga —todas son reacciones muy rápidas con esta enzima. El valor de k_{cat}/K_m para la superóxido dismutasa a 25°C es cercano a $2 \times 10^9\ M^{-1}\ s^{-1}$. Esta velocidad es todavía más rápida que la esperada para la asociación del sustrato con la enzima, con base en velocidades típicas de difusión. ¿Cómo es que la velocidad puede ser mayor que la velocidad de difusión? La explicación se encontró cuando se examinó la estructura de la enzima. Hay un campo eléctrico en torno al sitio activo de la superóxido dismutasa, que aumenta la velocidad de formación del complejo ES unas 30 veces. Como se ve en la figura 6.10, el átomo de cobre en el sitio activo está en el fondo de un canal profundo en la proteína. Los residuos

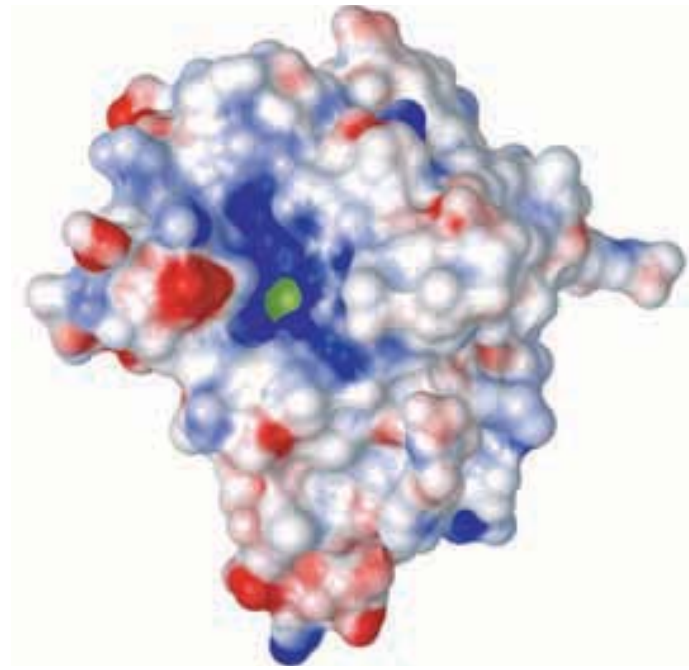


Figura 6.10 ▶
Carga en la superficie de la superóxido dismutasa humana. Se muestra la estructura de la enzima como un modelo para detallar la superficie de la proteína. Las regiones con carga positiva tienen color azul y las de carga negativa tienen color rojo. El átomo de cobre en el sitio activo es verde. Nótese que el canal que lleva al sitio de unión está recubierto con residuos hidrofílicos. [PDB 1HL5]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

hidrofílicos de aminoácido en el borde de la hendidura o bolsa formada por el sitio activo guían a los $\cdot O_2^{\ominus}$ cargados negativamente hacia la región con carga positiva que rodea al sitio activo. Los efectos electrostáticos permiten que la superóxido dismutasa se una y elimine al radical superóxido con mucha mayor rapidez de la esperada, de acuerdo con choques aleatorios de la enzima y el sustrato.

Es probable que haya muchas enzimas con mayores velocidades de enlace debido a efectos electrostáticos. En la mayor parte de los casos, el paso limitante de la velocidad es la catálisis, por lo que la velocidad total (k_{cat}/K_m) es menor que la máxima de una reacción controlada por difusión. Para las enzimas que tienen reacciones catalíticas rápidas, la selección natural podría favorecer el enlace rápido para aumentar la velocidad total. De igual modo, una enzima con enlazamiento rápido podría desarrollar un mecanismo que favoreciera una reacción más rápida. Sin embargo, la mayor parte de las reacciones bioquímicas proceden a velocidades que son más que suficientes para satisfacer las necesidades de la célula. Podría no haber presión selectiva significante en la mayor parte de las enzimas para que evolucionen en la dirección de mayor eficiencia. Esto explica por qué hay tan pocas enzimas con reacciones controladas por difusión.

6.5 Modos de enlazamiento en la catálisis enzimática

Son difíciles de evaluar los efectos cuantitativos de diversos mecanismos catalíticos. Ya hemos visto dos mecanismos químicos de catálisis enzimática: la catálisis ácido-base y la catálisis covalente. De acuerdo con estudios de catalizadores no enzimáticos, se estima que la catálisis ácido-base puede acelerar una reacción enzimática típica en un factor de entre 10 a 100. La catálisis covalente puede permitir la obtención del mismo aumento de velocidad.

Con lo importante que son estos modos químicos, sólo forman una pequeña parte de los aumentos observados de velocidad debidos a las enzimas (típicamente de 10^8 a 10^{12}). La capacidad que tienen las proteínas para unirse en forma específica y orientar a los ligandos explica el resto. El propio enlace de los reactivos en el sitio activo de la enzima provee no sólo la especificidad del sustrato y la reacción, sino también la mayor parte del poder catalítico de las enzimas. Hay dos modos catalíticos que se basan en los fenómenos de enlace. El primero es de reacciones multisustratos, que es la recolección y el posicionamiento correcto de las moléculas de sustrato en el sitio activo, aumentando sus concentraciones efectivas respecto a sus concentraciones en solución normal. Del mismo modo, el enlazamiento de un sustrato cerca de un residuo en el sitio activo disminuye la energía de activación, porque reduce la entropía y aumenta las concentraciones efectivas de estos dos reactivos. Las altas concentraciones efectivas favorecen la formación más frecuente de estados de transición. A este fenómeno se le llama el efecto de proximidad. Una catálisis eficiente requiere que la unión de reactivos con enzimas sea bastante débil, porque un enlazamiento extremadamente fuerte inactivaría a la catálisis.

El segundo modo catalítico principal que se produce en la interacción ligando-enzima es el mayor enlazamiento de los estados de transición con enzimas, en comparación con la unión de sustratos o productos. Este modo de catálisis se llama estabilización del estado de transición. Hay un equilibrio (no el equilibrio de la reacción) entre ES y el estado enzimático de transición, $ES^{\ddagger}$. La interacción entre la enzima y sus ligandos en el estado de transición desplaza este equilibrio hacia $ES^{\ddagger}$ y disminuye la energía de activación.

Los efectos de proximidad y de estabilización del estado de transición se ilustraron en la figura 6.3. Los experimentos parecen indicar que la proximidad puede hacer aumentar las velocidades de reacción más de 10 000 veces, y que la estabilización del estado de transición puede aumentar las velocidades de reacción cuando menos de igual modo. Las enzimas pueden alcanzar aumentos extraordinarios de velocidad cuando los dos efectos se multiplican por los efectos de la catálisis química.

Las fuerzas de enlace responsables de la formación de complejos ES y de la estabilización de $ES^{\ddagger}$ ya se conocían desde los capítulos 2 y 4 —interacciones entre cargas, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de van der Waals. Las interacciones entre cargas son más fuertes en ambientes no polares que en agua. Debido a que los sitios activos son no polares en su mayor parte, las interacciones carga-carga en los sitios activos de las enzimas pueden ser muy fuertes. Las cadenas laterales de residuos de aspartato, glutamato, histidina, lisina y arginina proporcionan grupos negativos

y positivos que forman pares de iones con sustratos en los sitios activos. Los siguientes en fuerza de enlace, son los puentes de hidrógeno, que con frecuencia se forman entre sustratos y enzimas. La columna vertebral del péptido y las cadenas laterales de muchos aminoácidos pueden formar puentes de hidrógeno. Los aminoácidos muy hidrofóbicos, al igual que la alanina, la prolina, el triptófano y la tirosina pueden participar en interacciones hidrofóbicas con los grupos no polares de los ligandos. Muchas interacciones débiles de van der Waals también ayudan a enlazar a sustratos. Téngase en cuenta que las propiedades químicas de los residuos de aminoácido y la forma del sitio activo de una enzima son las que determinan la especificidad hacia el sustrato.

A. El efecto de proximidad

▶ William P. Jencks (1927–) es autor de muchos avances experimentales y teóricos en el campo de la catálisis enzimática.

Durante muchos años se ha descrito a las enzimas como trampas de entropía, agentes que recolectan reactivos muy móviles de soluciones diluidas y disminuyen así su entropía, aumentando la probabilidad de su interacción. William Jencks y sus colegas son autores de un avance conceptual al considerar la reacción de dos moléculas colocadas en el sitio activo como una reacción intramolecular (unimolecular). El posicionamiento correcto de dos grupos reaccionantes en el sitio activo reduce sus grados de libertad y produce una gran pérdida de entropía, suficiente para explicar un gran aumento en la velocidad. Este aumento se expresa en términos de la concentración relativa aumentada, llamada molaridad efectiva, de los grupos reaccionantes en la reacción unimolecular. Se puede obtener la molaridad efectiva con la relación

$$\text{Molaridad efectiva} = \frac{k_1(\text{s}^{-1})}{k_2(\text{M}^{-1}\,\text{s}^{-1})} \qquad \textbf{(6.21)}$$

donde k_1 es la constante de velocidad cuando los reactivos están preensamblados en una sola molécula, y k_2 es la constante de velocidad para la reacción bimolecular correspondiente. En esta ecuación todas las unidades se cancelan, excepto las de M, por lo que la relación se expresa en unidades de molaridad. Las molaridades efectivas no son concentraciones reales; de hecho, para algunas reacciones los valores son ilógicamente grandes. Sin embargo, las molaridades efectivas indican qué tan favorable están orientados los grupos reactivos.

El efecto de proximidad fue ilustrado por el trabajo de Thomas Bruice y Upendra K. Pandit, en cuyos experimentos se comparó una reacción bimolecular no enzimática con una serie de reacciones intramoleculares químicamente parecidas (figura 6.11). La reacción bimolecular fue la hidrólisis del acetato de *p*-bromofenilo en dos pasos, catalizada por acetato y efectuada mediante la formación del anhídrido acético. (El segundo paso, la hidrólisis del anhídrido acético, no se muestra en la figura 6.11). En la versión unimolecular se unieron los grupos reaccionantes por un puente que tenía una restricción cada vez mayor para la rotación. Con cada restricción que se impuso a las moléculas de sustrato, aumentó en forma notable la constante relativa de velocidad (k_1/k_2). Nótese que las reacciones intramoleculares no implicaron catálisis verdadera; en vez de ello, el sustrato estaba unido en forma covalente al catalizador, y no hubo reciclamiento del catalizador. El éster de glutarato (compuesto 2) tiene dos enlaces que permiten la libertad de rotación, en tanto que el éster de succinato (compuesto 3) sólo tiene uno. El compuesto más restringido, el compuesto 4, bicíclico rígido, no tiene libertad de rotación. En este compuesto, el carboxilato está cerca del éster, y los grupos reaccionantes están alineados en forma adecuada. La molaridad efectiva del grupo carboxilato es 5×10^7 M. El compuesto 4 tiene una probabilidad de reacción extremadamente alta, porque se debe perder muy poca entropía para llegar al estado de transición. Las consideraciones teóricas parecen indicar que el máximo aumento de la velocidad que cabe esperar por el efecto de proximidad es alrededor de 10^8. Esta aceleración total se puede atribuir a la pérdida de entropía que se tiene cuando dos reactivos están en posiciones correctas para la reacción. Estas reacciones intramoleculares pueden servir como modelo de posicionamiento de dos sustratos unidos en el sitio activo de una enzima.

B. Enlazamiento débil de sustratos con enzimas

Las reacciones de complejos ES son análogas a las reacciones unimoleculares. La posición correcta de los sustratos en un sitio activo produce un gran aumento de la velocidad.

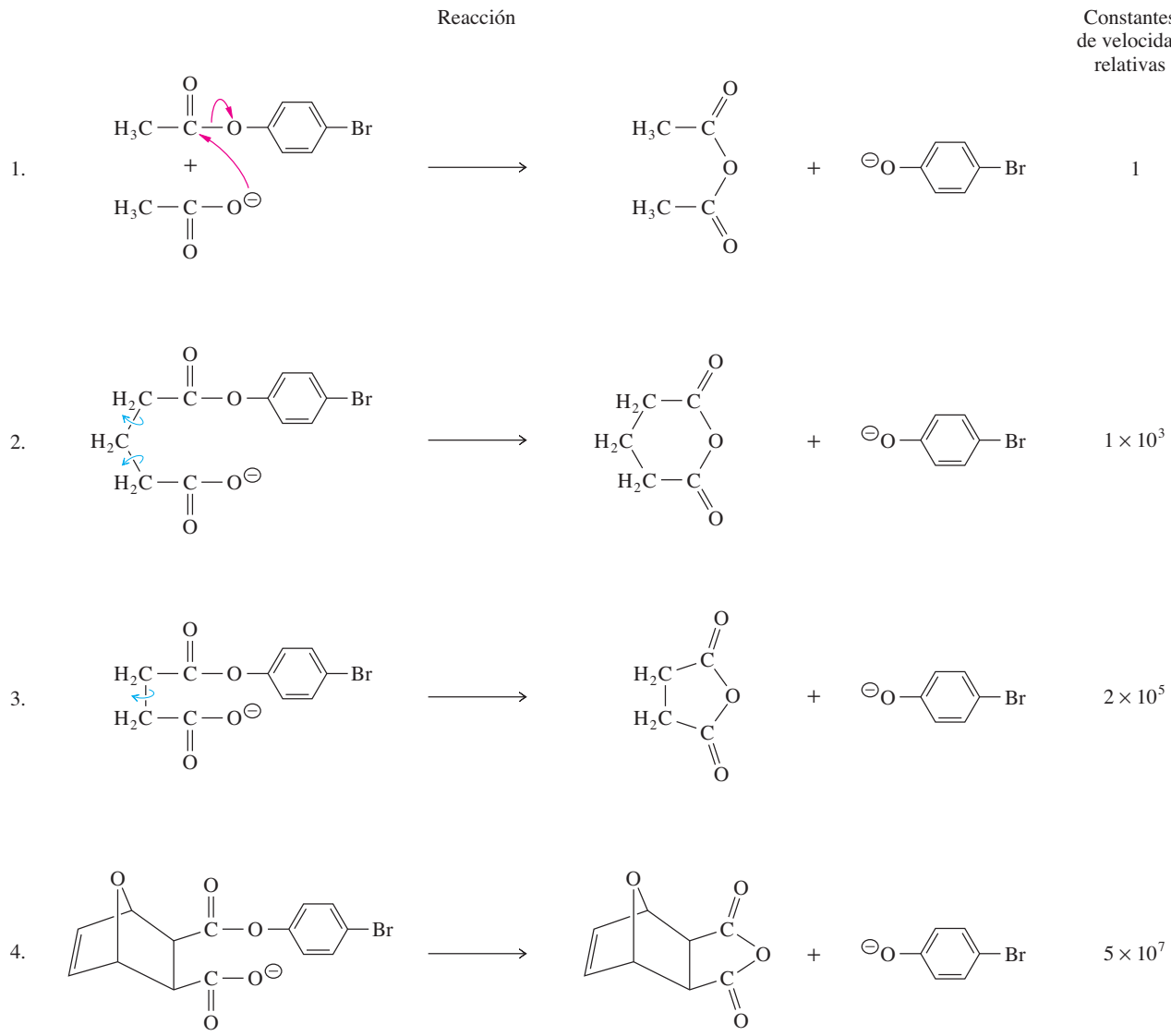


Figura 6.11 ▲
Reacciones de una serie de carboxilatos con ésteres de fenilo sustituidos. Se ilustra el efecto de la proximidad por un aumento en la velocidad observada cuando los reactivos se sujetan más rígidamente en la proximidad. La reacción 4 es 50 millones de veces más rápida que la reacción 1, la reacción bimolecular.

Sin embargo, las enzimas no alcanzan el aumento máximo de 10^8 teóricamente alcanzable por el efecto de proximidad. En forma típica, la pérdida de entropía al enlazarse el sustrato permite un aumento de la velocidad cercano a 10^4. En complejos ES, los reactivos son aproximados, pero no en forma extrema, al estado de transición. Esta conclusión se basa tanto en razonamiento mecanicista como en mediciones de la fuerza de enlace de sustratos e inhibidores con las enzimas. El enlazamiento de sustratos con enzimas no puede ser muy fuerte; esto es, los valores de K_m no pueden ser extremadamente bajos.

La figura 6.12 se muestran los diagramas de energía para una reacción unimolecular no enzimática, y para la reacción correspondiente en varios pasos catalizada por una enzima. Como se verá en la siguiente sección, una enzima aumenta la velocidad de una reacción al estabilizar (es decir, unirse fuertemente a) el estado de transición. Por consiguiente, la energía necesaria para que ES llegue al estado de transición ($ES^{\ddagger}$) en la reacción enzimática es menor que la que se requiere para que S llegue a $S^{\ddagger}$, el estado de transición en la reacción no enzimática. Recuérdese que el sustrato debe estar unido

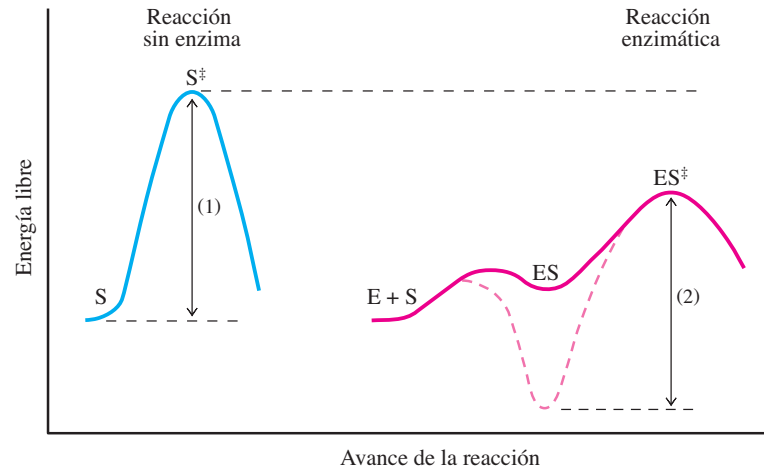


Figura 6.12 ▶
Energía de unión con el sustrato. En esta reacción hipotética, la enzima acelera la velocidad de la reacción al estabilizar el estado de transición. Además, la barrera de activación para la formación del estado de transición $ES^{\ddagger}$ a partir de ES debe ser relativamente baja. Si la enzima se une con mucha fuerza al sustrato (perfil de línea interrumpida), la barrera de activación (2) sería comparable a la barrera de activación de la reacción sin enzima (1).

débilmente en el complejo ES. Si un sustrato se enlazara muy fuertemente, se podría necesitar tanta energía para llegar a $ES^{\ddagger}$ a partir de ES (flecha marcada con 2), como la requerida para llegar a $S^{\ddagger}$ desde S en la reacción no enzimática (flecha indicada con 1). En otras palabras, un enlazamiento muy fuerte del sustrato significaría poca o nada de catálisis. A la estabilidad excesiva de ES se le llama trampa termodinámica. La función de las enzimas es unirse y ubicar a los sustratos antes de llegar al estado de transición, pero no con tanta fuerza que el complejo ES sea muy estable.

Los valores de K_m (que representan constantes de disociación) de las enzimas con sus sustratos indican que las enzimas evitan la trampa termodinámica. La mayor parte de los valores de K_m son del orden de 10^{-4} M, número que indica un enlazamiento débil del sustrato. Las enzimas específicas para sustratos pequeños, como la urea, el dióxido de carbono y el anión superóxido, tienen valores relativamente altos de K_m (de 10^{-3} a 10^{-4} M) porque estas moléculas pueden formar pocos enlaces no covalentes con las enzimas. En forma típica, las enzimas tienen valores bajos de K_m (de 10^{-6} a 10^{-5} M) para las coenzimas, que son más voluminosas que muchos sustratos. Los valores de K_m para el enlazamiento de ATP a la mayor parte de las enzimas que necesitan ATP son aproximadamente de 10^{-4} M, o mayores, pero la miosina, proteína de las fibras musculares (la cual no es una enzima) une ATP unas mil millones de veces con más avidez. Esta gran diferencia en el enlazamiento refleja que en un complejo ES no todas las partes del sustrato están enlazadas.

Cuando la concentración de un sustrato dentro de una célula es menor que el valor de K_m de su enzima correspondiente, el equilibrio de la reacción de unión $E + S \rightleftharpoons ES$ favorece a E + S. En otras palabras, la formación del complejo ES está un poco cuesta arriba, desde el punto de vista de energía (figuras 6.3 y 6.12), y el complejo ES está más cerca de la energía del estado de transición que del estado basal. Esta débil unión de sustratos acelera las reacciones. Parece que los valores de K_m se optimizaron por evolución hacia una catálisis efectiva —lo bastante baja como para lograr la proximidad, pero suficientemente alta para que el complejo ES no sea demasiado estable. El débil enlazamiento de los sustratos es una propiedad importante de otra de las fuerzas principales que impulsan la catálisis enzimática, que es el mayor enlazamiento de reactivos en el estado de transición $ES^{\ddagger}$.

C. Ajuste inducido

La mayor parte de las enzimas parecen catalizadores sólidos porque tienen una flexibilidad limitada, pero las enzimas no son moléculas totalmente rígidas. Los átomos de las proteínas hacen movimientos pequeños y rápidos en forma constante, y hay pequeños ajustes de conformación cuando se unen a ligandos. Una enzima es más efectiva si está al principio en su forma activa, para que no se consuma energía de enlazamiento en convertirla a una conformación activa. Sin embargo, en algunos casos las enzimas sufren grandes alteraciones en su forma cuando se unen a moléculas de sustrato. La enzima pasa de una forma inactiva a una activa. La activación de una enzima por un cambio

▶ Daniel E. Koshland, Jr. (1920-) realizó diversas investigaciones sobre enzimas que incluyeron el descubrimiento de cambios de conformación inducidos por el sustrato (ajuste inducido).

de conformación iniciado por el sustrato se llama **ajuste inducido.** El ajuste inducido no es un modo catalítico, sino principalmente un efecto de especificidad del sustrato.

En la década de 1950, Daniel Koshland sugirió que la flexibilidad de la enzima interviene en la actividad catalítica y en la especificidad del sustrato. Su propuesta de ajuste inducido se basó en experimentos cinéticos con hexocinasa, enzima que cataliza la fosforilación de la glucosa por el ATP:

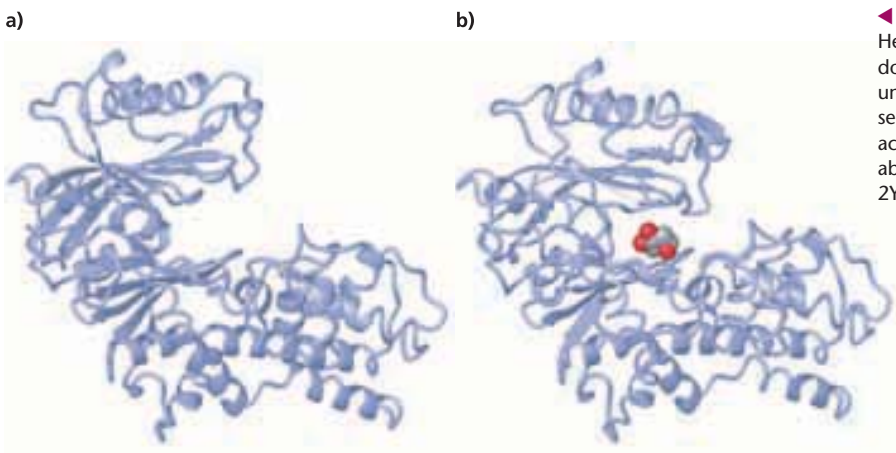
$$\text{Glucosa} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{Glucosa 6-fosfato} + \text{ADP} \qquad \textbf{(6.22)}$$

El agua (HOH), que se parece al grupo alcohol (ROH) del C-6 en la glucosa, es lo bastante pequeña y tiene la forma adecuada para caber en el sitio activo de la hexocinasa, por lo que debería ser un buen sustrato. Si el agua entrara al sitio activo, la hexocinasa catalizaría con rapidez la hidrólisis del ATP. Sin embargo, se demostró que la hidrólisis de ATP catalizada por hexocinasa es unas 40 000 veces más lenta que la fosforilación de la glucosa. Con experimentos estructurales con hexocinasa se demuestra que existe en dos conformaciones, una forma abierta cuando no hay glucosa y una forma cerrada cuando la glucosa está enlazada. El ángulo entre los dos dominios de la hexocinasa cambia 12° cuando se une la glucosa, cerrando la hendidura en el complejo enzima-glucosa (figura 6.13). El agua no es un sustrato tan grande como para inducir un cambio de conformación de la hexocinasa, lo cual explica por qué el agua no estimula la hidrólisis del ATP. Así, el cierre del sitio activo de la hexocinasa, inducido por el azúcar, evita el desperdicio con la hidrólisis del ATP. Hay varias otras cinasas que tienen mecanismos de ajuste inducido.

La especificidad del sustrato que hay en el mecanismo de ajuste inducido de la hexocinasa economiza ATP celular, pero tiene un precio catalítico. La energía de enlace consumida para mover la molécula de proteína para que entre a la forma cerrada —una conformación menos favorecida— es energía que no puede usarse en la catálisis. En consecuencia, una enzima que use un mecanismo de ajuste inducido es menos efectiva como catalizador que una enzima hipotética que siempre tenga una forma activa y catalice la misma reacción. El costo catalítico de ajuste inducido hace más lentas a las cinasas, por lo que sus valores de k_{cat} son de unos 10^3 s^{-1} (tabla 5.1). En la sección 13.3(1) se verá otro ejemplo de ajuste inducido y la forma en que se economiza energía metabólica.

D. Estabilización del estado de transición

Durante años se han usado los términos *tensión* y *distorsión* para describir la catálisis enzimática. Se sugirió que las enzimas, como catalizadores sólidos, catalizan las reacciones al distorsionar a los sustratos en forma física o electrónica. La estabilización del estado de transición, la interacción aumentada de la enzima con el sustrato en el estado de transición, sólo es una forma más sutil de explicar la tensión. Algunos enzimólogos han estimado que la estabilización del estado de transición explica casi todos los aumentos de velocidad de reacción causados por las enzimas. Si bien es probable que haya varios factores (que ya se describieron) que contribuyan a la catálisis enzimática, hoy se considera que la estabilización del estado de transición es el factor principal —la última pieza del rompecabezas de la catálisis.



◀ Figura 6.13
Hexocinasa de levadura. Esta cinasa contiene dos dominios estructurales conectados por una región de bisagra. Al unirse a la glucosa se cierran estos dominios y protegen al sitio activo contra el agua. **a)** Conformación abierta. **b)** Conformación cerrada. [PDB 2YHX y 1HKG].

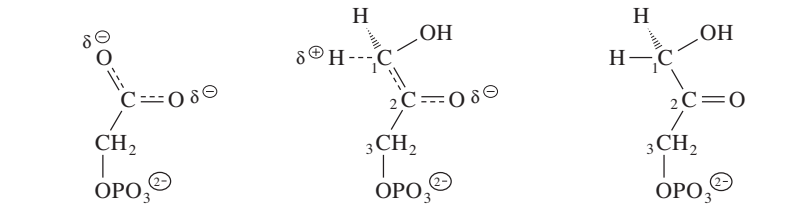
Recuérdese la teoría de la llave y la cerradura, para la especificidad de las enzimas, debida a Emil Fischer (sección 5.2B). Fischer propuso que las enzimas son plantillas rígidas que sólo aceptan determinados sustratos como si fueran llaves. Aunque esta teoría perdió adeptos durante las décadas de 1950 y 1960, hoy es una explicación de aceptación general para la especificidad enzimática, y también para la catálisis enzimática, pero con una estipulación: la "llave" es el estado de transición, y no la molécula de sustrato. Después de que un sustrato se enlaza a una enzima, la enzima distorsiona la estructura del sustrato y lo fuerza hacia el estado de transición. La interacción máxima con la molécula del sustrato sólo sucede en el $ES^{\ddagger}$. Una parte de este enlazamiento en el $ES^{\ddagger}$ puede estar entre la enzima y las partes no reaccionantes del sustrato. Los efectos de unir partes no reaccionantes de sustratos se pueden ver comparando la hidrólisis del enlace peptídico de la fenilalanina en *N*-acetil-Phe-Gly-NH_2 catalizada por quimotripsina, con la hidrólisis del enlace peptídico en *N*-acetil-Phe-Ala-NH_2. Estos sustratos sintéticos tienen valores parecidos de K_m, pero el último sustrato tiene una cadena lateral de metilo que sustituye a un átomo de hidrógeno, y tiene una k_{cat} que es 20 veces mayor.

Una enzima debe ser complementaria al estado de transición en forma y en carácter químico. La figura 6.12 muestra que la unión fuerte del estado de transición con una enzima hace disminuir la energía de activación. Como la diferencia de energía entre E + S y $ES^{\ddagger}$ es bastante menor que la diferencia de energías entre S y $S^{\ddagger}$, k_{cat} es mayor que k_n (la constante de velocidad para la reacción no enzimática). El estado de transición enzima-sustrato $ES^{\ddagger}$ es menor en la energía absoluta —y en consecuencia es más estable— que el estado de transición del reactivo en la reacción no catalizada. Algunos estados de transición pueden enlazarse a sus enzimas de 10^{10} a 10^{15} veces más fuertemente que sus sustratos. La afinidad de otras enzimas hacia sus estados de transición no necesita ser tan extremas. Una de las principales tareas en bioquímica es indicar cómo sucede la estabilización del estado de transición.

La estabilización comparativa de $ES^{\ddagger}$ podría presentarse si una enzima tiene un sitio activo con una forma y una estructura electrostática que se ajustara más al estado de transición que al sustrato. Una molécula de sustrato no distorsionada no estaría totalmente enlazada. Por ejemplo, una enzima podría tener sitios que se unen a las cargas parciales que sólo hay en el estado de transición inestable. Además, en el sitio activo totalmente cerrado y no acuoso, los arreglos de carga que suceden en el estado de transición tal vez se asocien a algunos enlaces consolidados. Ciertos puentes de hidrógeno —que se conocen como puentes de hidrógeno de barrera baja— entre la enzima y el estado de transición pueden ser enlaces de tipo covalente más cortos, que pueden efectuar la catálisis al estabilizar el estado de transición. Estos puentes de hidrógeno de fuerza excepcional se forman cuando los átomos electronegativos están a menos de 0.25 nm de distancia, y sus valores respectivos de pK_a son similares en el microambiente de la proteína. En la figura 6.7 ya se presentó un ejemplo de este tipo de puente de hidrógeno fuerte. Otro ejemplo es el de las serina proteasas (sección 6.7).

Los **análogos al estado de transición** son compuestos estables cuyas estructuras se parecen a los estados de transición supuestos. Algunas de las pruebas del papel del estado de transición en los mecanismos enzimáticos provienen del uso de estos análogos. Los mismos estados de transición no son compuestos estables, sino estados transitorios en los que se forman y rompen enlaces. Sin embargo, se pueden sintetizar sustancias que se parecen a estas especies activadas. Si es correcta la teoría de llave y cerradura modificada, un análogo al estado de transición debería unirse con mucha fuerza a la enzima adecuada —con mucha más fuerza que el sustrato— y sería así un potente inhibidor. La constante de disociación de un análogo del estado de transición debería ser de unos 10^{-13} M o menos. Uno de los primeros ejemplos de un análogo de estado de transición fue el 2-fosfoglicolato (figura 6.14), cuya estructura se parece al estado de transición en la reacción catalizada por la triosa fosfato isomerasa (sección 6.4A). Este análogo del estado de transición se une a la isomerasa cuando menos con 100 veces más fuerza que cualquiera de los sustratos de la enzima. La fuerte unión se debe a un átomo de oxígeno parcialmente negativo en el grupo carboxilato del 2-fosfoglicolato, propiedad compartida con el estado de transición pero no con los sustratos.

Experimentos con adenosina desaminasa han identificado un análogo del estado de transición, que se une a la enzima con una sorprendente afinidad, porque se parece mucho



◀ Figura 6.14
2-Fosfoglicolato, un estado de transición análogo para la enzima triosa fosfato isomerasa. Se supone que el 2-fosfoglicolato es un análogo del C-2 y C-3 del estado de transición (centro) entre la dihidroxiacetona fosfato (derecha) y el inicial intermedio enodiolato en la reacción.

al estado de transición. La adenosina desaminasa cataliza la conversión hidrolítica de la purina del nucleósido adenosina a inosina. El primer paso de esta reacción es la adición de una molécula de agua (figura 6.15a). El complejo con agua, llamado hidrato covalente, se forma tan pronto como la adenosina se une a la enzima, y se descompone rápidamente formando los productos. La adenosina desaminasa tiene amplia especificidad hacia sustratos, y cataliza la eliminación hidrolítica de varios grupos en la posición 6 de los nucleósidos de purina. Sin embargo, el inhibidor ribonucleósido de purina (figura 6.15b) tiene sólo hidrógeno en la posición 6, y sólo participa en el primer paso enzimático de la hidrólisis, con la adición de la molécula de agua. El hidrato covalente que se forma es un análogo al estado de transición, un inhibidor competitivo que tiene una $K_i = 3 \times 10^{-13}$ M. (En comparación, la constante de afinidad de la adenosina desaminasa hacia su estado de transición se espera sea 3×10^{-17} M). El enlazamiento de este análogo supera a la unión del sustrato o del producto en un factor mayor que 10^8. Un inhibidor reducido muy parecido, el 1,6-dihidropurina ribonucleósido (figura 6.15c), carece del grupo hidroxilo en el C-6, y su K_i sólo es 5×10^{-6} M. Por consiguiente, se puede concluir que la adenosina desaminasa debe unirse en forma específica y con avidez al análogo del estado de transición —y también al estado de transición— por interacción con el grupo hidroxilo en el C-6.

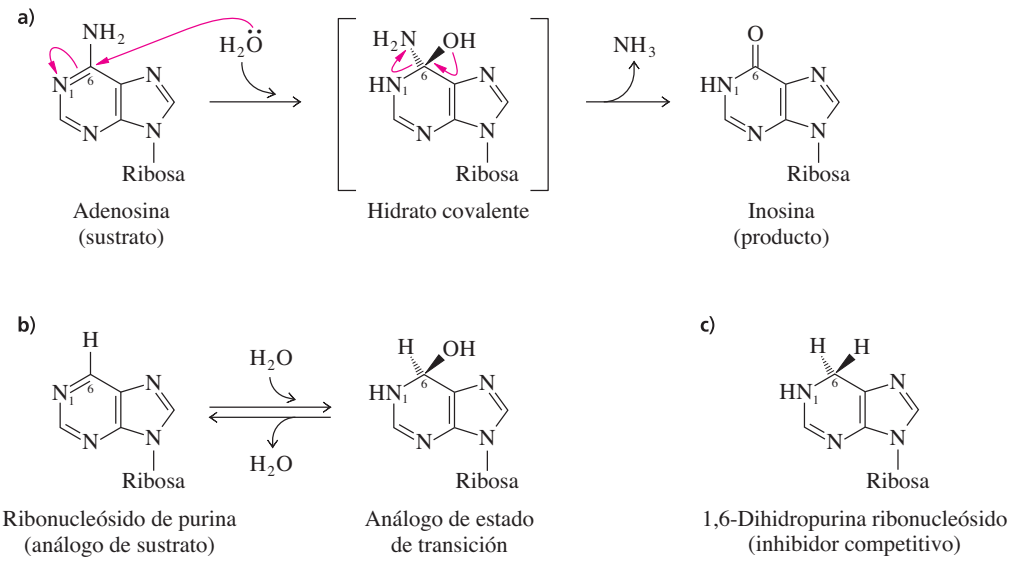


Figura 6.15 ▲
Inhibición de adenosina desaminasa por un análogo de estado de transición. **a)** En la desaminación de la adenosina, se agrega un protón al N-1 y un ion hidróxido se agrega al C-6, para formar un hidrato covalente inestable, el cual se descompone y produce inosina y amoniaco. **b)** El inhibidor ribonucleósido de purina también forma rápidamente un hidrato covalente, el 6-hidroxi-1,6-dihidropurina ribonucleósido. Este hidrato covalente es un análogo de estado de transición que se une más de un millón de veces más ávidamente que otro inhibidor competitivo, el 1,6-dihidropurina ribonucleósido **c)**, que sólo difiere del análogo de estado de transición por la ausencia del grupo 6-hidroxilo.

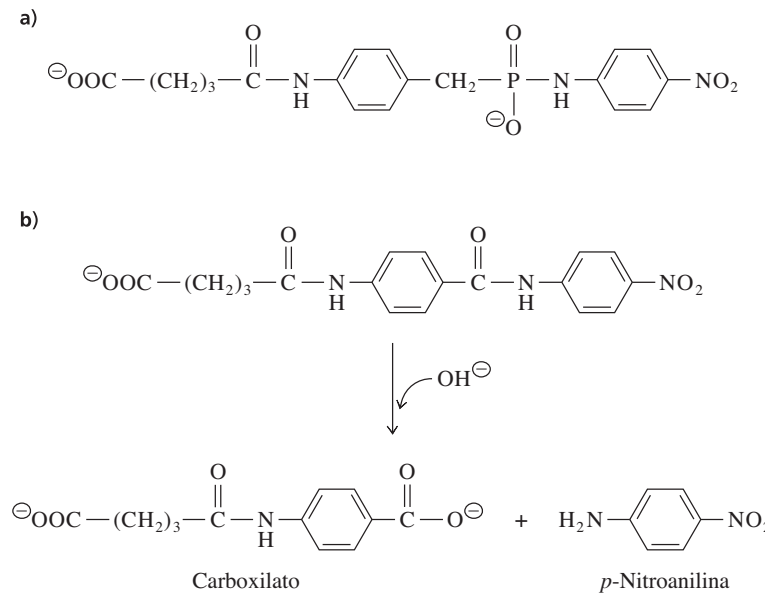


Figura 6.16 ▶
Hidrólisis de amida catalizada por un anticuerpo. **a)** El antígeno utilizado para inducir el anticuerpo fue un fosfonamidato acoplado a una proteína portadora. **b)** El sustrato de la reacción catalizada por el anticuerpo es una *p*-nitroanilina.

Los **anticuerpos catalíticos** son anticuerpos que tienen actividad catalítica, y se pueden inducir usando análogos de estado de transición como antígenos, enlazados a proteínas acarreadoras. En el caso normal, los anticuerpos no catalizan reacciones bioquímicas. De hecho, sólo algunos pocos de los anticuerpos que se forman contra análogos de estado de transición son los que tienen actividad catalítica. Sin embargo, esos pocos anticuerpos tienen la especificidad esperada hacia el sustrato, y tienen un aumento modesto de la velocidad, hasta de 10^5. Es posible que los anticuerpos formados contra análogos de estados de transición también puedan unirse y estabilizar a los estados de transición, y con ello puedan catalizar las reacciones.

La figura 6.16 ilustra uno de los mejores ejemplos de catálisis por anticuerpo. Se formaron anticuerpos de un fosfonamidato sintético (figura 6.16a) cuya estructura se parece al estado de transición tetraédrico en la hidrólisis de la amida análoga. Se aisló un anticuerpo con actividad catalítica y se encontró que cataliza la hidrólisis de la amida sintética (figura 6.16b) con las mayores velocidades a pH de 9 o mayor. A 37°C, la actividad catalítica aproximada es de 1/25 de la velocidad de la hidrólisis de una amida a 25°C y pH 7, catalizada por quimotripsina, lo que demuestra que el anticuerpo es un catalizador potente. El anticuerpo catalítico tiene una especificidad bastante estrecha hacia el sustrato. Además de la estabilización del estado de transición, este anticuerpo usa catálisis covalente, quizá por acilación de un residuo de histidina.

6.6 Lisozima

La lisozima cataliza la hidrólisis de algunos polisacáridos, en especial los que forman las paredes celulares de las bacterias. Es la primera enzima cuya estructura fue resuelta, y por esta razón ha habido un interés duradero en desarrollar su mecanismo preciso de acción. Muchas secreciones como lágrimas, saliva y moco nasal, contienen actividad de lisozima para ayudar a evitar infecciones bacterianas. (La lisozima causa la *lisis* o ruptura de las células bacterianas). La lisozima mejor estudiada es la de la clara de huevo de gallina.

El sustrato de la lisozima es un polisacárido formado por residuos alternantes de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido *N*-acetilmurámico (MurNAc) unidos por enlaces glicosídicos (figura 6.17). En forma específica, la lisozima cataliza la hidrólisis del enlace glicosídico entre el C-1 del residuo MurNAc y el átomo de oxígeno en el C-4 de un residuo de GlcNAc.

Se han obtenido modelos de la lisozima y sus complejos con los sacáridos mediante análisis cristalográfico con rayos X (figura 6.18). La hendidura de unión con el sustrato

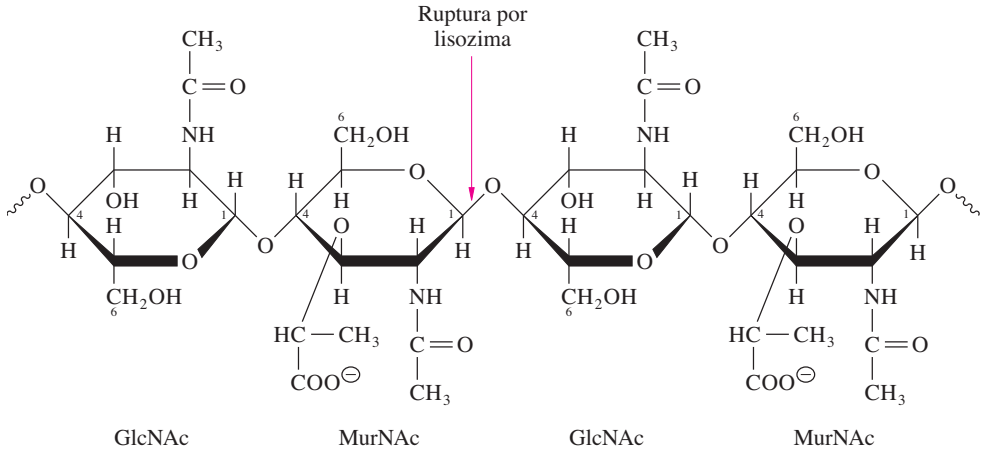


Figura 6.17 ▲
Estructura de una porción con cuatro residuos de un polisacárido de pared bacteriana. La lisozima cataliza la escisión catalítica del enlace glicosídico entre el C-1 del MurNAc y el átomo de oxígeno del enlace glicosídico.

de lisozima da cabida a seis residuos de sacárido en seis sitios (designados de A a F). Las moléculas de azúcar caben con facilidad en todos los sitios del modelo estructural, excepto en uno; una molécula de azúcar como el MurNAc no cabe en el modelo en el sitio D, a menos que se distorsione en una conformación de media silla (figura 6.19). Dos residuos iónicos de aminoácido, Glu-35 y Asp-52, están cerca del C-1 de la molécula distorsionada de azúcar en el sitio de unión D. El residuo Glu-35 es una región no polar de la hendidura, y tiene un pK_a perturbado cercano a 6.5. El Asp-52, en un ambiente más polar, tiene un pK_a cercano a 3.5. El pH óptimo de la lisozima es cercano a 5 entre estos dos valores de pK_a.

En la figura 6.20 se muestra el mecanismo propuesto para la lisozima. Cuando una molécula de polisacárido se enlaza a la lisozima, los residuos de MurNAc se unen a los sitios B, D y F (no hay cavidad para la cadena lateral de lactilo del MurNAc, en el sitio A, C o E). La unión extensa del oligosacárido parece distorsionar al residuo de MurNAc en el sitio D, para que adopte la conformación de media silla. Se forma un enlace casi covalente entre Asp-52 y el compuesto intermedio postulado (un oxocarbocatión inestable). Las pruebas recientes parecen indicar que esta interacción podría ser más como un enlace covalente que como un par iónico fuerte, pero hay mucha controversia acerca de este punto. Es interesante que todavía haya detalles del mecanismo de la lisozima que se deben resolver, después de casi cincuenta años de esfuerzos.

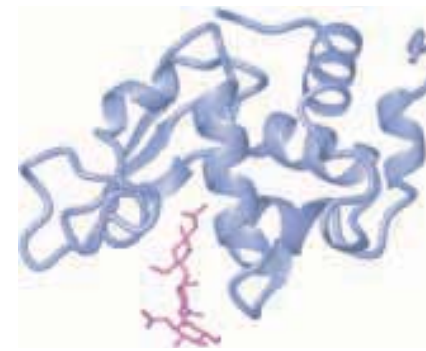
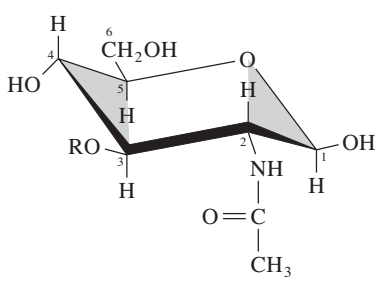


Figura 6.18 ▲
Lisozima de pollo con una molécula de trisacárido (figura inferior). El ligando se une en los sitios A, B y C. Tres residuos más de monosacárido pueden caber en un modelo de este sitio activo, pero el residuo de azúcar en el sitio D debe distorsionarse. [PDB 1HEW].

a) Conformación de silla



b) Conformación de media silla

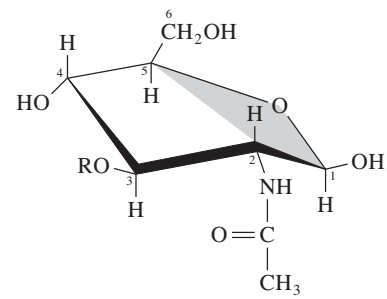


Figura 6.19 ▲
Conformaciones del ácido *N*-acetilmurámico. **a)** Conformación de silla. **b)** Conformación de media silla, propuesta para el azúcar unido al sitio D de la lisozima. R representa el grupo lactilo del MurNAc.

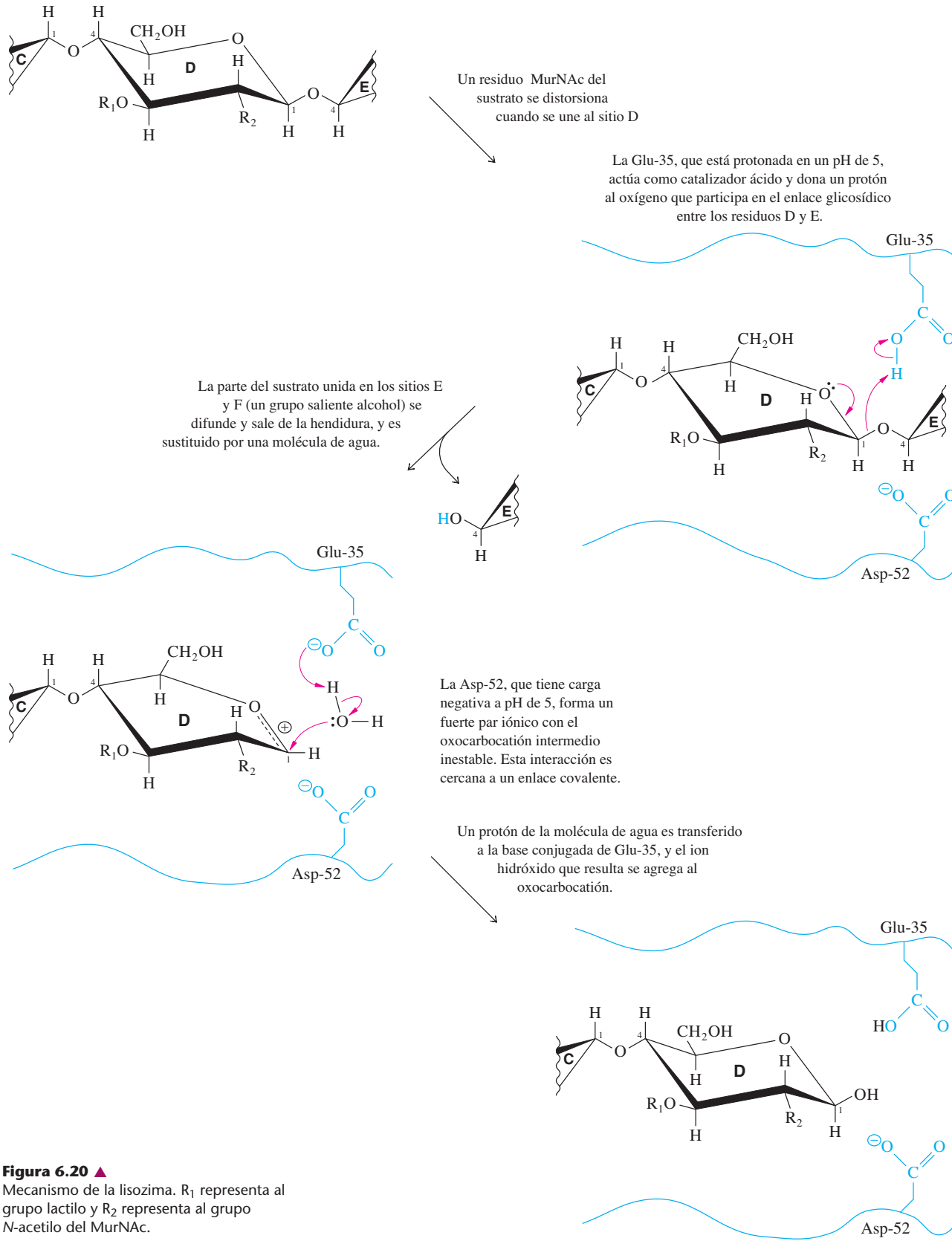


Figura 6.20 ▲
Mecanismo de la lisozima. R_1 representa al grupo lactilo y R_2 representa al grupo *N*-acetilo del MurNAc.

La lisozima es sólo un representante de un gran grupo de glicósido hidrolasas. En fecha reciente se determinaron las estructuras de una celulasa bacteriana y sus complejos con sustratos, intermedios y productos. Esta glicosidasa tiene un mecanismo un poco diferente al de la lisozima; forma un compuesto intermedio covalente glicosilo-enzima, y no el fuerte par iónico postulado para la lisozima. Otros aspectos de su mecanismo, tal como la distorsión de un residuo de azúcar y la interacción con cadenas laterales de sitio activo, —COOH y —$COO^{\ominus}$, se parecen a los del mecanismo de la lisozima. Las estructuras de los complejos enzimáticos demuestran que la distorsión del sustrato lo impulsa hacia el estado de transición.

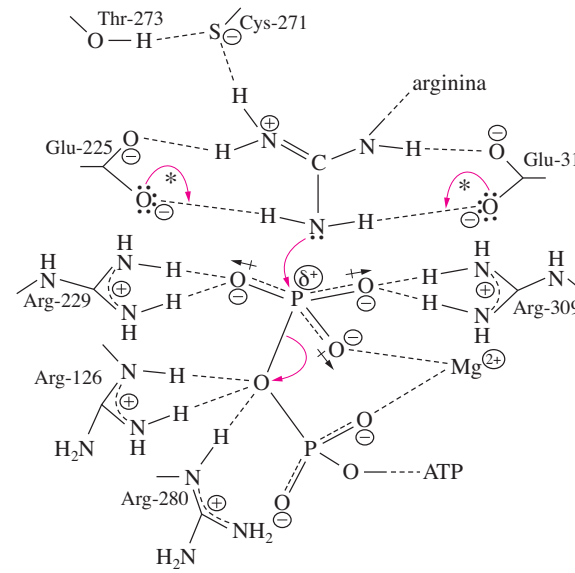
RECUADRO 6.2 Estado de transición propuesto para una reacción bimolecular

La mayor parte de las reacciones enzimáticas para las que se han dilucidado los mecanismos detallados son bastante sencillas: isomerizaciones o reacciones con agua como segundo reactivo. Por consiguiente, para evaluar los efectos de proximidad y el grado de estabilización del estado de transición, es preferible estudiar una reacción más complicada, como la catalizada por la arginina cinasa:

$$\text{Arginina} + \text{MgATP} \rightleftharpoons \text{Arginina fosfato} + \text{MgADP} + H^{\oplus}$$

La estructura de un complejo de análogo de estado de transición-enzima, de arginina cinasa, se ha determinado con alta resolución. Sin embargo, más que estudiar el tipo normal de análogo de estado de transición en el que los reactivos se funden por enlaces covalentes, aquí se usaron tres componentes separados: arginina, nitrato (para modelar el grupo fosforilo transferido entre arginina y ADP) y ADP. El examen cristalográfico del sitio activo con estos tres compuestos, mediante rayos X, llevó a proponer una estructura del estado de transición y un mecanismo para la reacción (véase la figura abajo). Los resultados cristalográficos demostraron que la enzima tiene un movimiento muy restringido de la especie enlazada (y quizá también del estado de transición). Por ejemplo, el grupo fosforilo terminal del ATP se mantiene en su lugar mediante cuatro cadenas laterales de arginina y un ion Mg^{2+} enlazado, y el grupo guanidinio de la molécula de sustrato de arginina se sujeta firmemente por dos cadenas laterales de glutamato. La enzima alinea a los componentes en forma precisa y adecuada.

La arginina cinasa, como otras cinasas, es una enzima de ajuste inducido (sección 6.5C). Cuando se cristaliza en presencia de arginina, nitrato y ADP, asume la forma cerrada. Esta enzima tiene una k_{cat} aproximadamente de $3 \times 10^{-3}\ s^{-1}$ y valores de K_m mayores que 10^{-4} M para arginina y ATP; esos valores son bastante típicos de las cinasas. El movimiento que hay durante la unión de ajuste inducido de los sustratos ha alineado con precisión a éstos, que antes habían estado unidos en forma bastante débil, como lo indican sus valores moderados de K_m. En esta reacción enzimática participan al menos cuatro efectos catalíticos interrelacionados: proximidad (recolección y alineamiento de moléculas de sustrato), enlazamiento inicial bastante débil del sustrato, catálisis ácido-base y estabilización del estado de transición (tensión de los sustratos hacia la forma del estado de transición).



▶ Estructura propuesta para el sitio activo de la arginina cinasa en presencia de ATP y arginina. Las moléculas del sustrato son sujetadas firmemente y alineadas hacia el estado de transición, como indican las líneas interrumpidas. Los asteriscos (*) muestran que podrían actuar, ya sea Glu-225 o Glu-314, como un catalizador ácido-base general. Adaptado de Zhov, G., Somasundaram, T., Blanc, E., Parthasarathy, G., Ellington, W. R. y Chapman, M. S. (1998). Transition state structure of arginine kinase: implications for catalysis of bimolecular reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 8453.

6.7 Propiedades de las serina proteasas

Las serina proteasas son una clase de enzimas que separan el enlace peptídico de las proteínas. Como lo señala su nombre, se caracterizan por la presencia de un residuo de serina catalítico en sus sitios activos. Las serina proteasas mejor estudiadas son las enzimas relacionadas tripsina, quimotripsina y elastasa. Estas enzimas proporcionan una excelente oportunidad para explorar la relación entre la estructura de la proteína y la función catalítica. Se han estudiado extensamente durante 50 años y constituyen una parte importante de la historia de la bioquímica, y el esclarecimiento de los mecanismos enzimáticos. En esta sección se observará cómo se regula la actividad de las serina proteasas mediante la activacion zimógena y se examinará la base estructural en relación con la especificidad del sustrato de diferentes serina proteasas.

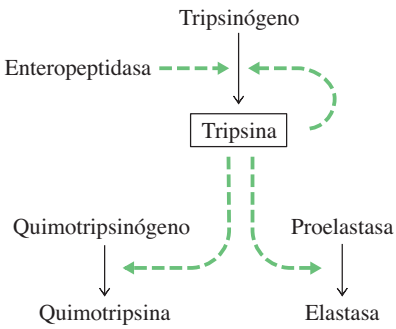


Figura 6.21 ▲
Activación de algunos zimógenos pancreáticos. Al principio, la enteropeptidasa cataliza la activación de tripsinógeno a tripsina. Entonces la tripsina activa al quimotripsinógeno, la proelastasa y a otras moléculas más de tripsinógeno.

A. Los zimógenos son los precursores inactivos de las enzimas

Los mamíferos digieren los alimentos en sus estómagos e intestinos. Durante este proceso, las proteínas alimenticias sufren una serie de reacciones hidrolíticas al pasar por el tracto digestivo. Después de la desintegración mecánica al masticar y mojar con saliva, los alimentos se ingieren y se mezclan con ácido clorhídrico en el estómago. El ácido desnaturaliza a las proteínas, y la pepsina (proteasa que funciona en forma óptima en un medio ácido) cataliza la hidrólisis de las proteínas para formar una mezcla de péptidos. Esta mezcla pasa al intestino, donde se neutraliza con bicarbonato de sodio y se digiere por la acción de varias proteasas, formando aminoácidos y pequeños péptidos que pueden absorberse en el torrente sanguíneo.

Las serina proteasas tripsina, quimotripsina y elastasa catalizan gran parte de la digestión de los péptidos en el intestino. Al principio, esas enzimas se sintetizan y almacenan en el páncreas como precursores inactivos llamados zimógenos. Los zimógenos se llaman tripsinógeno, quimotripsinógeno y proelastasa. Es importante guardar estas enzimas hidrolíticas en forma de precursores inactivos dentro de la célula, ya que las proteasas activas matarían a las células pancreáticas rompiendo las proteínas del citoplasma. Cuando los zimógenos son segregados desde el páncreas hacia el intestino delgado, se activan por proteólisis selectiva, mediante la ruptura enzimática de uno o unos pocos enlaces peptídicos específicos. En forma específica, una proteasa llamada enteropeptidasa activa al tripsinógeno y forma la tripsina, catalizando la ruptura de su enlace Lys-6—Ile-7. Una vez activada por eliminación de su hexapéptido N-terminal, la tripsina rompe de manera proteolítica los demás zimógenos pancreáticos, incluyendo a más moléculas de tripsinógeno (figura 6.21). La formación de tripsina activa por la acción de la enteropepsidasa se puede considerar como el paso maestro de activación.

La activación del quimotripsinógeno para formar quimotripsina es catalizada por la tripsina y por la quimotripsina misma. Se rompen cuatro enlaces peptídicos (entre los residuos 13 y 14, 15 y 16, 146 y 147, y 148 y 149) y el resultado es la liberación de dos dipéptidos. A pesar de las dos rupturas en su columna vertebral, la quimotripsina conserva su forma tridimensional. Esta estabilidad se debe en parte a la presencia de cinco puentes de disulfuro en la proteína.

La cristalografía con rayos X ha revelado una gran diferencia entre la conformación del quimotripsinógeno y la de la quimotripsina —como es la pérdida de una hendidura hidrofóbica implicada en la unión con el sustrato en el zimógeno. Las diferencias se muestran en la figura 6.22, donde se sobreponen las estructuras del quimotripsinógeno y la quimotripsina. Al activarse el zimógeno, el grupo α recién formado de la Ile-16 gira hacia adentro e interactúa con el grupo β-carboxilo de Asp-194 para formar un par iónico. Este cambio local de conformación tira de la cadena lateral de Met-192 alejándola de sus contactos hidrofóbicos en el zimógeno, generando así una hendidura de unión con el sustrato, relativamente hidrofóbica. Cerca del sitio de unión con el sustrato están los tres residuos catalíticos con cadenas laterales ionizables (Asp-102, His-57 y Ser-195).

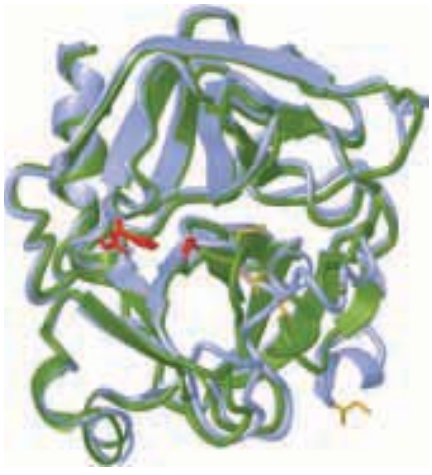
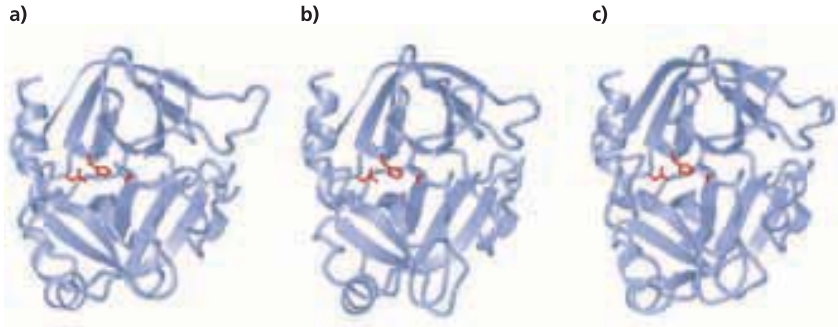


Figura 6.22 ▲
Cadenas de polipéptido del quimotripsinógeno (azul) [PDB 2CGA] y de α-quimotripsina (verde) [PDB 5CHA]. Los grupos Ile-16 y Asp-194 en el zimógeno y en la enzima activa se muestran en amarillo. Los residuos de sitio catalítico (Asp-102, His-57 y Ser-195) se muestran en rojo. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

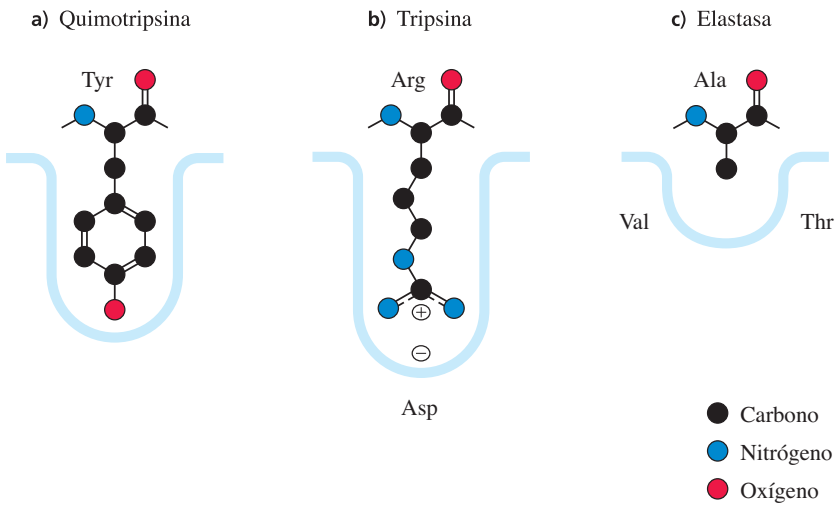


◀ Figura 6.23
Comparación de las estructuras polipeptídicas de **a)** quimotripsina [PDB 5CHA] **b)** tripsina [PDB 1TLD] y **c)** elastasa [PDB 3EST]. Los residuos en el centro catalítico se muestran en gris oscuro.

B. Especificidad de las serina proteasas hacia el sustrato

La quimotripsina, la tripsina y la elastasa son enzimas similares que comparten un ancestro común; en otras palabras, son homólogas. Cada enzima tiene una estructura bilobulada cuyo sitio activo está en una hendidura entre los dos dominios. Las posiciones de las cadenas laterales de los residuos de serina, histidina y aspartato en los sitios activos son casi idénticas en las tres enzimas (figura 6.23).

Las especificidades de quimotripsina, tripsina y elastasa hacia los sustratos se han explicado mediante diferencias relativamente pequeñas en sus estructuras. Recuérdese que la tripsina cataliza la hidrólisis de los enlaces peptídicos cuyos grupos carbonilo son de arginina o lisina. Tanto la quimotripsina como la tripsina contienen una hendidura o bolsa de unión que posiciona a los sustratos en forma correcta para el ataque nucleofílico por parte de un residuo de serina en el sitio activo. Cada proteasa tiene una región extendida similar, donde caben los polipéptidos, pero la llamada hendidura o bolsa de especificidad cerca de la serina de sitio activo es muy diferente para cada enzima. La tripsina difiere de la quimotripsina porque en la quimotripsina hay un residuo inalterado de serina en la base de la hendidura hidrofóbica de unión. En la tripsina, este residuo es de aspartato (figura 6.24). En el complejo ES, este residuo de aspartato con carga negativa forma un par iónico con la cadena lateral de un residuo de arginina o lisina, con carga positiva, del sustrato. Experimentos con tripsina mutada en forma específica indican que el residuo de aspartato en la base de la hendidura de especificidad es un factor principal en la especificidad del sustrato, pero hay otras partes de la molécula que también afectan la especificidad.



◀ Figura 6.24
Sitios de enlace de quimotripsina, tripsina y elastasa. Los distintos sitios de enlace de estas tres serina proteasas son determinantes primarios de sus especificidades hacia el sustrato. **a)** La quimotripsina tiene una hendidura o bolsa hidrofóbica que se une a las cadenas laterales de residuos de aminoácido aromático o grupos voluminosos. **b)** Un residuo de aspartato con carga negativa en el fondo de la bolsa de unión de la tripsina permite que ésta se enlace a las cadenas laterales con carga positiva de residuos de lisina y arginina. **c)** En la elastasa, las cadenas laterales de un residuo de valina y uno de treonina en el sitio de unión crean una hendidura o bolsa de enlace superficial. La elastasa sólo se une a residuos de aminoácido con cadenas laterales pequeñas, en especial de residuos de glicina y alanina. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

La elastasa cataliza la degradación de la elastina, una proteína fibrosa rica en residuos de glicina y alanina. Su estructura terciaria es parecida a la de la quimotripsina, excepto que su hendidura o bolsa de enlace es mucho más superficial. Dos residuos de glicina que están en la entrada del sitio de unión de la quimotripsina y la tripsina se sustituyen en la elastasa por residuos de valina y treonina, que son más grandes (figura 6.24c). Esos residuos mantienen a sustratos potenciales con cadenas laterales largas alejados del centro catalítico. Así, la elastasa rompe en forma específica a proteínas que tienen residuos pequeños, como glicina y alanina.

C. Catálisis química y por modos de enlazamiento de las serina proteasas

Ahora se examinará el mecanismo de la quimotripsina y las funciones de los tres residuos catalíticos: His-57, Asp-102 y Ser-195. Muchas enzimas catalizan la ruptura de enlaces amida o éster por el mismo proceso, por lo que se puede aplicar el estudio del mecanismo de la quimotripsina a una familia grande de hidrolasas.

El residuo Asp-102 está sepultado en un ambiente bastante hidrofóbico. Está unido con un puente de hidrógeno a la His-57, que a su vez está enlazado con un puente de hidrógeno a la Ser-195 (figura 6.25). Este grupo de residuos de aminoácido se llama tríada catalítica. El ciclo de la reacción comienza cuando la His-57 sustrae un protón de la Ser-195 (figura 6.26). Así se crea un nucleófilo poderoso (Ser-195) que terminará por atacar al enlace peptídico. Se favorece el inicio de esta parte de la reacción porque la Asp-102 estabiliza la histidina, promoviendo su capacidad para atacar a la serina.

El descubrimiento de que la Ser-195 es un residuo catalítico de la quimotripsina fue sorprendente, porque la cadena lateral de serina en general no es suficientemente ácida como para sufrir desprotonación y servir como nucleófilo fuerte. El grupo hidroximetilo de un residuo de serina tiene, en general, un pK_a aproximado de 16, y se parece en reactividad al grupo hidroxilo del etanol. El lector recordará, según la química orgánica, que aunque el etanol se puede ionizar y formar un etóxido, esta reacción requiere la presencia de una base extremadamente fuerte, o el tratamiento con un metal alcalino. Más adelante se verá cómo el sitio activo de la quimotripsina, en presencia de un sustrato, logra esta ionización.

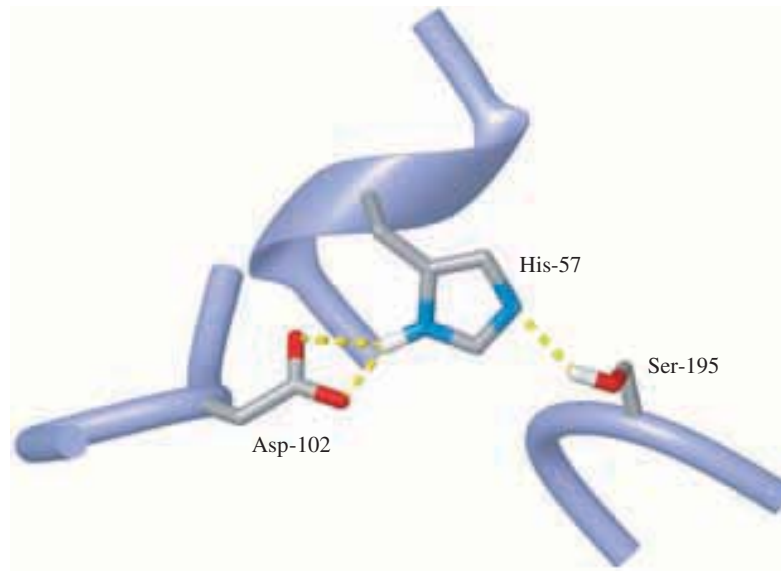


Figura 6.25 ▶
El sitio activo de la quimotripsina. Los residuos del sitio activo, Asp-102, His-57 y Ser-195 se ordenan en una red de puentes de hidrógeno. La conformación de esos residuos es estabilizada por un puente de hidrógeno entre el oxígeno carbonilo de la cadena lateral de carboxilato en Asp-102, y el nitrógeno del enlace peptídico de His-57. Los átomos de oxígeno en los residuos de sitio activo están en rojo, y los átomos de nitrógeno en azul oscuro [PDB 5CHA]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

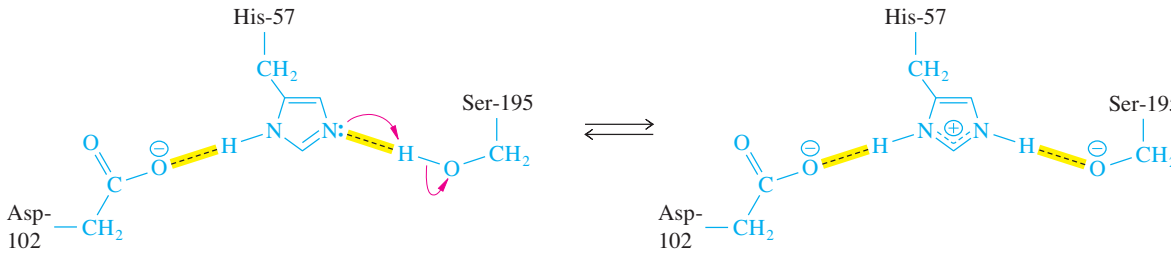


Figura 6.26 ▲
Tríada catalítica de la quimotripsina. El anillo de imidazol en His-57 saca al protón de la cadena lateral de hidroximetilo en Ser-195 (al que está unido con puente de hidrógeno) y así hace que el residuo Ser-195 sea un potente nucleófilo. Esta interacción se facilita por interacción del ion imidazolio con su otro socio unido con puente de hidrógeno, el grupo β-carboxilato de Asp-102 oculto. Los residuos de la tríada se representan en un arreglo similar al de la figura 6.25.

Un mecanismo detallado propuesto para la quimotripsina y las serina proteasas relacionadas incluye a la catálisis covalente (por un oxígeno nucleofílico) y a la catálisis general ácido-base (donación de un protón para formar un grupo saliente). Los pasos del mecanismo propuesto se ilustran en la figura 6.27.

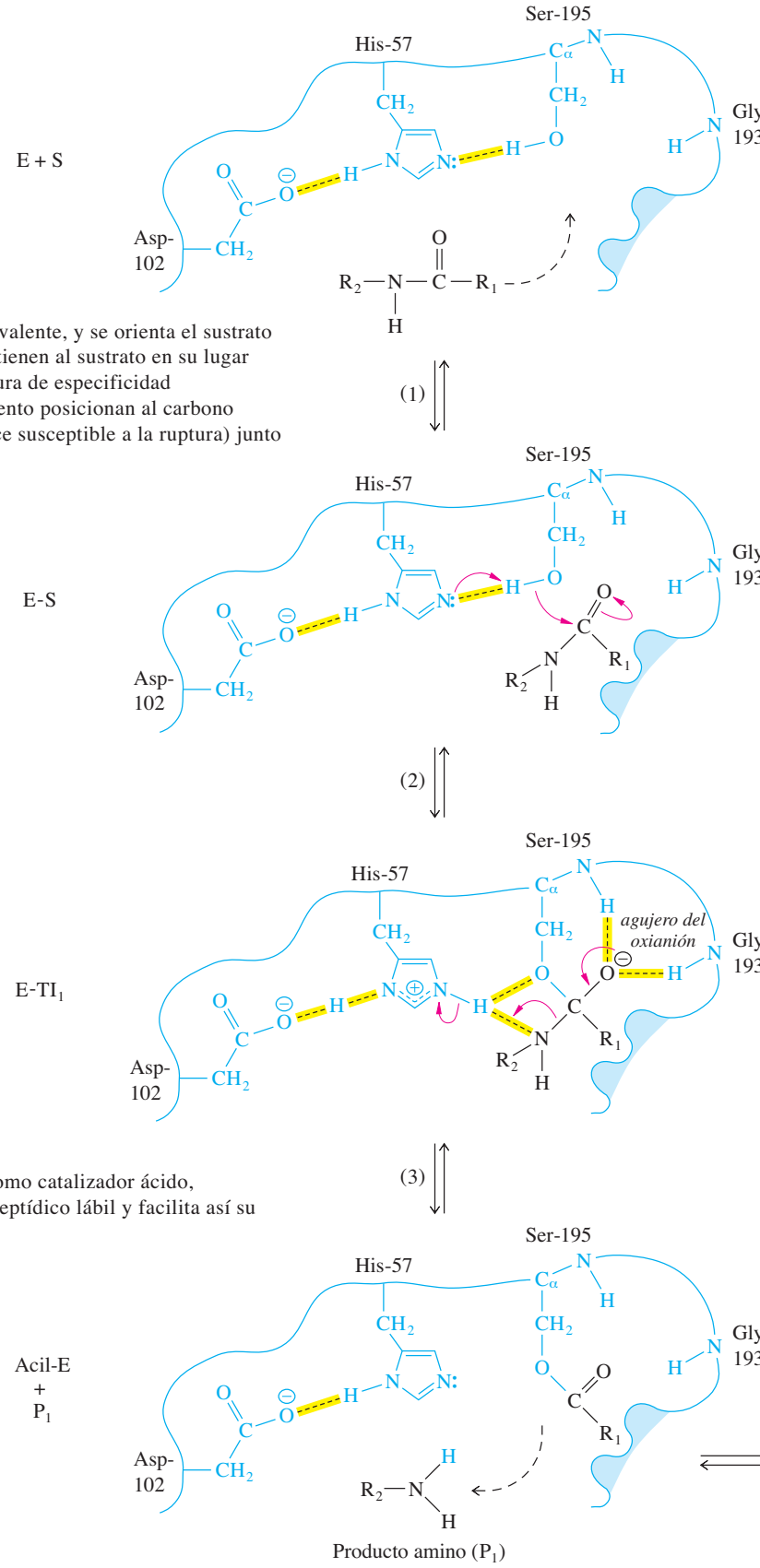
La unión con el sustrato de péptido causa un pequeño cambio de conformación en la quimotripsina, comprimiendo estéricamente Asp-102 e His-57. Se forma un puente de hidrógeno de barrera baja entre estas cadenas laterales, y el pK_a de la His-57 aumenta de 7 a 11, aproximadamente. (La formación de este enlace fuerte, casi covalente, impulsa a los electrones hacia el segundo átomo de N del anillo del imidazol en la His-57, haciéndola más básica). Este aumento de basicidad hace que la His-57 sea una base general eficaz para sustraer un protón del —CH_2OH en la Ser-195. Este mecanismo explica cómo se transforma el grupo alcohol, normalmente inerte en la serina, en un potente nucleófilo.

Se ha usado la mutagénesis dirigida al sitio para evaluar la importancia relativa de los aminoácidos en la tríada catalítica Ser-His-Asp en la quimotripsina y otras serina proteasas. Por ejemplo, los experimentos con subtilisina, una serina proteasa bacteriana, han revelado que al sustituir el catalizador covalente (serina) o el catalizador ácido-base (histidina) por alanina, el resultado fue una gran pérdida de actividad proteolítica. Sin embargo, aun cuando se mutaron los tres residuos de la tríada catalítica, la velocidad catalítica de la enzima todavía fue 3 000 veces mayor que la velocidad no enzimática. La catálisis residual apreciable se puede atribuir a efectos de unión, como la estabilización del estado de transición.

Todos los modos catalíticos descritos en este capítulo se usan en los mecanismos de las serina proteasas. En el esquema de reacción de la figura 6.27, en los pasos 1 y 4 de la dirección de avance, se usa el efecto de proximidad, la recolección de reactivos. Por ejemplo, cuando una molécula de agua sustituye a la amina P_1 en el paso 4, es sujetada por la histidina, provocando un efecto de proximidad. La catálisis ácido-base por la histidina hace bajar las barreras de energía para los pasos 2 y 4. Hay catálisis covalente que usa el —CH_2OH de la serina en los pasos 2 a 5. Se cree que los intermedios tetraédricos en los pasos 2 y 4 (E-TI_1 y E-TI_2) son parecidos a los estados de transición para estos pasos. Los puentes de hidrógeno en el agujero del oxianión estabilizan a estos compuestos intermedios, que son formas de oxianión del sustrato, al unirlos con más fuerza a la enzima en comparación con la fuerza con que estaba unido el sustrato. Los modos químicos de catálisis (catálisis ácido-base y covalente), y los modos de enlace de catálisis (efecto de proximidad y estabilización de estado de transición) contribuyen a la actividad enzimática de las serina proteasas.

Ya con una perspectiva de los mecanismos generales de las enzimas, se podrá continuar examinando reacciones donde intervienen las coenzimas. Estas reacciones necesitan de grupos que no son suministrados por las cadenas laterales de aminoácido.

Figura 6.27▶
Mecanismo de la ruptura de un enlace peptídico catalizada por quimotripsina.



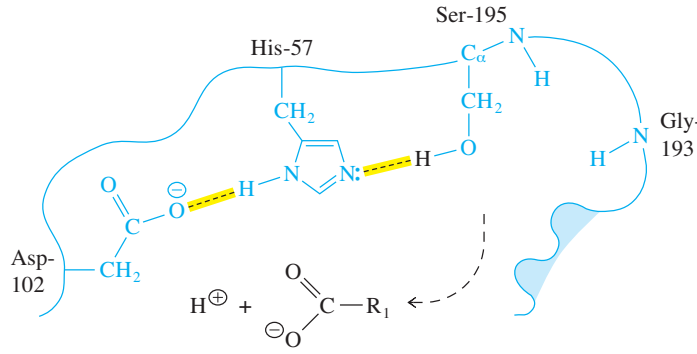
Se forma el complejo enzima-sustrato no covalente, y se orienta el sustrato para la reacción. Las interacciones que mantienen al sustrato en su lugar incluyen la unión del grupo R_1 en la hendidura de especificidad (sombreada). Las interacciones de enlazamiento posicionan al carbono carbonilo del enlace peptídico lábil (el enlace susceptible a la ruptura) junto al oxígeno de Ser-195.

La unión del sustrato comprime a la Asp 102 y la His-57. Esta tensión se alivia con la formación de un puente de hidrógeno de barrera baja. El pK_a mayor de la His-57 permite que el anillo de imidazol saque a un protón del grupo hidroxilo de la Ser-195. El oxígeno nucleofílico de la Ser-195 ataca al carbono carbonilo del enlace peptídico para formar un intermedio tetraédrico (E-TI_1), que se cree se parece al estado de transición.

Cuando se forma el intermedio tetraédrico, cambia el enlace C—O con el sustrato de un doble enlace a un enlace sencillo, que es más largo. Eso permite que el oxígeno con carga negativa (el oxianión) del intermedio tetraédrico pase a una posición antes vacía, llamada agujero del oxianión, donde pueden formar puentes de hidrógeno con los grupos —NH de la Gly-193 y la Ser-195 en la cadena del péptido.

El anillo de imidazolio de la His-57 actúa como catalizador ácido, donando un protón al nitrógeno del enlace peptídico lábil y facilita así su ruptura.

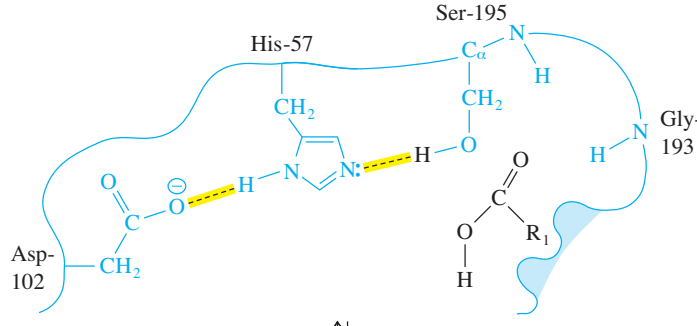
El grupo carbonilo del péptido forma un enlace covalente con la enzima y produce un intermedio de acil-enzima. Después de que sale del sitio activo el producto peptídico (P_1) con el nuevo amino terminal, entra agua.



$E + P_2$

(6)

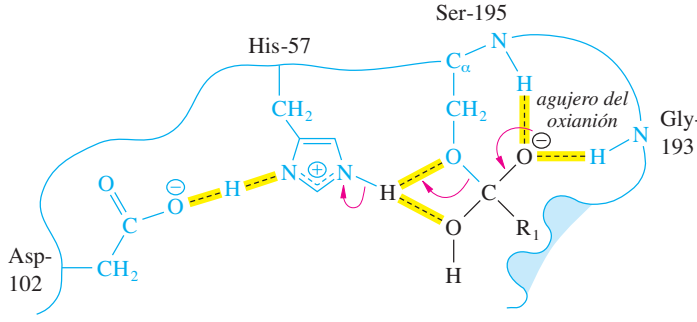
El producto carboxilato es liberado del sitio activo y se regenera la quimotripsina libre.



$E\text{-}P_2$

Se forma el segundo producto (P_2), un polipéptido con un nuevo carboxi terminal.

(5)

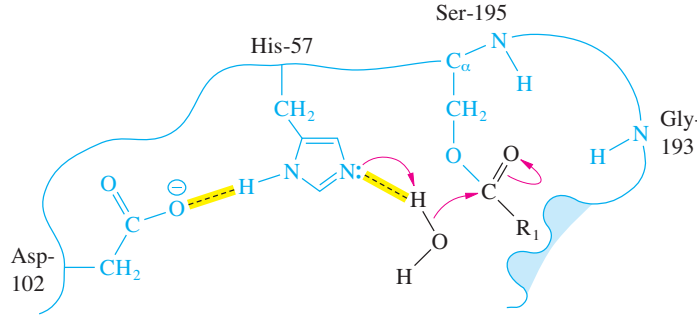


$E\text{-}TI_2$

La His-57, que de nuevo es un ion de imidazolio, dona un protón y causa el colapso del segundo intermedio tetraédrico.

(4)

Se forma un segundo intermedio tetraédrico ($E\text{-}TI_2$) que es estabilizado por el agujero del oxianión.



Acil-E + H_2O

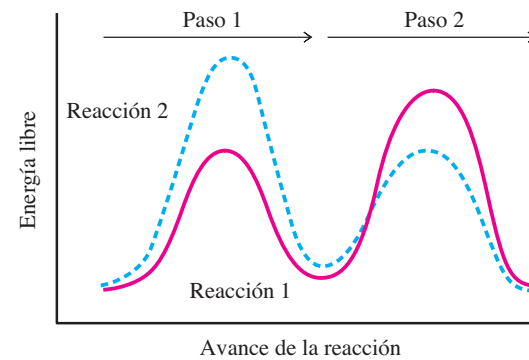
Comienza la hidrólisis (desacilación) de la acil-enzima intermedia cuando la Asp-102 y la His-57 forman de nuevo un puente de hidrógeno de barrera baja, y la His-57 remueve a un protón de la molécula de agua para dar un grupo $OH^{\ominus}$ que ataque al grupo carbonilo del éster.

Resumen

1. Los cuatro modos principales de catálisis enzimática son catálisis ácido-base y catálisis covalente (modos químicos), así como proximidad y estabilización del estado de transición (modos de enlazamiento). Los detalles de las reacciones a nivel atómico se describen con mecanismos de reacción, que se basan en el análisis de experimentos cinéticos y en las estructuras de las proteínas
2. Para cada paso en una reacción, los reactivos pasan por un estado de transición. La diferencia de energía entre los reactivos estables y el estado de transición es la energía de activación. Los catalizadores permiten que las reacciones sean más rápidas al bajar la energía de activación.
3. Los residuos de aminoácido ionizables en los sitios activos forman centros catalíticos. Estos residuos pueden participar en la catálisis ácido-base (adición o eliminación de protón) o en la catálisis covalente (unión covalente de una parte del sustrato a la enzima). Los efectos del pH sobre la velocidad de una reacción enzimática pueden indicar cuáles residuos participan en la catálisis.
4. Las velocidades catalíticas de unas cuantas enzimas son tan altas que se acercan al límite físico superior de las reacciones en solución, que es la velocidad con la que se acercan los reactivos entre sí debido a la difusión.
5. La mayor parte del aumento de velocidad que produce una enzima se debe a la unión de los ligandos reaccionantes a la enzima.
6. El efecto de proximidad es el aumento de la velocidad de reacción debido a la formación de un complejo ES no covalente, que reúne y orienta a los reactivos causando una disminución de la entropía.
7. Una enzima se une con bastante debilidad a sus sustratos. Un enlace demasiado fuerte estabilizaría al complejo ES y haría más lenta la reacción.
8. Una enzima se une a un estado de transición con mayor afinidad que con la que se une a sus sustratos. La evidencia de la estabilización del estado de transición se obtiene con análogos de estado de transición, que son inhibidores enzimáticos, y también por estudios de anticuerpos catalíticos.
9. Algunas enzimas, en especial las cinasas, usan ajuste inducido (activación inducida por el sustrato, donde interviene un cambio de conformación) para evitar el desperdicio de un sustrato reactivo por hidrólisis.
10. El mecanismo propuesto para la lisozima, una enzima que cataliza la hidrólisis de paredes celulares bacterianas, incluye distorsión del sustrato y estabilización de un oxocarbocatión intermedio.
11. Muchas serina proteasas son sintetizadas en forma de zimógenos inactivos que se activan fuera de la célula, bajo condiciones adecuadas, por proteólisis selectiva. El examen de serina proteasas con cristalografía de rayos X muestra cómo las estructuras tridimensionales de las proteínas pueden revelar información acerca de los sitios activos, incluyendo la unión con sustratos específicos.
12. Los sitios activos de las serina proteasas contienen una tríada catalítica Ser-His-Asp. El residuo de serina sirve como catalizador covalente, y el residuo de histidina sirve como catalizador ácido-base. Los compuestos intermedios tetraédricos aniónicos se estabilizan por puentes de hidrógeno con la enzima.

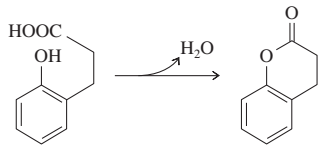
Problemas

1. a) ¿Qué fuerzas intervienen en el enlazamiento de sustratos y compuestos intermedios a los sitios activos de las enzimas?
   b) Explique por qué una unión muy fuerte de un sustrato con una enzima no es lo adecuado para la catálisis enzimática, en tanto que el enlazamiento fuerte del estado de transición sí es deseable.
2. La enzima OMP descarboxilasa es una de las más eficientes que se conocen, porque acelera la velocidad de descarboxilación de la orotidina 5′ monofosfato en un factor de 10^{17}. Con estudios del efecto del isótopo nitrógeno-15 se ha demostrado que dos mecanismos principales que intervienen son: 1) desestabilización del estado base del complejo ES por repulsión electrostática entre la enzima y el sustrato, y 2) estabilización del estado de transición debido a interacciones electrostáticas favorables entre la enzima y ES‡. Dibuje un diagrama de energía que muestre la forma en que estos dos efectos promueven la catálisis.
3. A continuación se ven los diagramas de energía de dos reacciones en varios pasos. ¿Cuál es el paso determinante de la velocidad de cada reacción?

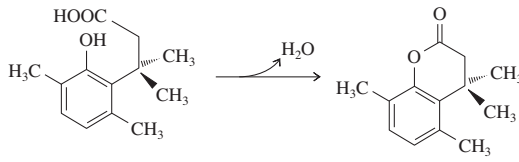


4. La reacción 2 que se indica abajo sucede 2.5×10^{11} veces más rápidamente que la reacción 1. ¿Cuál será la principal razón de este enorme aumento de velocidad en la reacción 2? ¿Cuál es la importancia de este modelo para interpretar mecanismos posibles para aumentos de velocidad por las enzimas?

Reacción 1



Reacción 2



5. Indique cuatro mecanismos principales para la lisozima, y explique cómo se usa cada uno durante la hidrólisis de un enlace glicosídico catalizada por la enzima.

6. Hay múltiples residuos de serina en la α-quimotripsina, pero sólo la serina-195 reacciona con rapidez cuando la enzima se trata con inhibidores activos de fosfato, por ejemplo fluorofosfato de diisopropilo (DFP, diisopropyl fluorophosphate). Explique por qué.

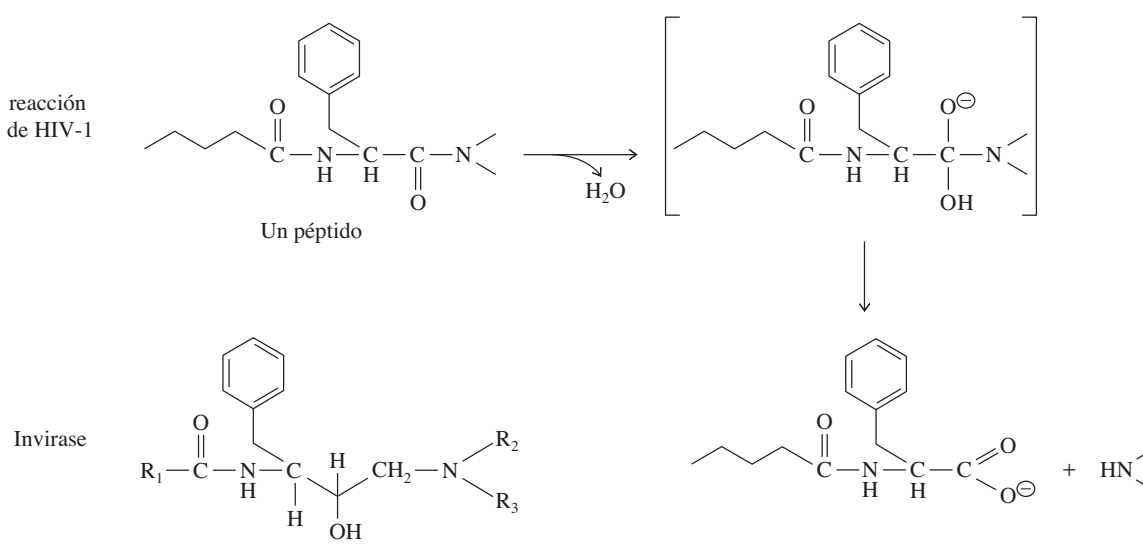
7. a) Identifique los residuos en la tríada catalítica de la α-quimotripsina, e indique el tipo de catálisis implicada para cada residuo.
b) ¿Cuáles grupos aminoácido adicionales se encuentran en el agujero del oxianión, y qué papel tienen en la catálisis?
c) Explique por qué la mutagénesis dirigida al sitio, del aspartato a asparagina en el sitio activo de la tripsina hace bajar 10 000 veces la actividad catalítica.

8. Los agrupamientos de tríada catalítica de residuos de aminoácido aumentan el carácter nucleofílico de los residuos de serina, treonina o cisteína en el sitio activo, presentes en muchas enzimas que intervienen en la catálisis del rompimiento de los enlaces amida o éster presentes en el sustrato. Use como modelo un sistema de α-quimotripsina y haga un diagrama de los arreglos esperados de las tríadas catalíticas en las enzimas siguientes.
a) citomegalovirus proteasa humana: His, His, Ser
b) β-lactamasa: Glu, Lys, Ser
c) Asparaginasa: Asp, Lys, Thr
d) Hepatitis A proteasa: Asp, (H_2O), His, Cys (una molécula de agua está entre los residuos Asp e His).

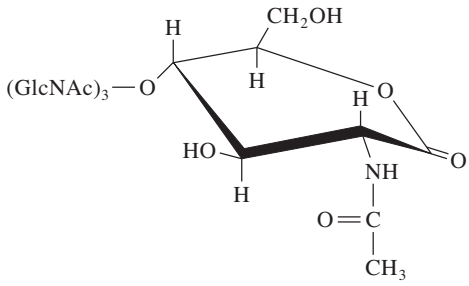
9. La proteasa del virus de inmunodeficiencia humana 1 (HIV-1) posee una díada catalítica de dos residuos de aspartato (un residuo en cada uno de los dos dominios idénticos: Asp-25, pKa = 3.3, y Asp-25′, pKa = 5.3). En el primer paso de la hidrólisis del péptido, un aspartato funciona como una base y acepta un protón de una molécula de agua; el otro aspartato funciona como un ácido y dona un protón a un grupo carbonilo del péptido. El intermedio tetraédrico que resulta no está unido covalentemente con la enzima. Escriba un mecanismo para la HIV-1 proteasa.

10. Trace la curva pH-velocidad que es de esperar para la proteasa del problema 9.

11. El Invirase (Hoffman-LaRoche), medicamento contra el sida (síndrome de inmuno deficiencia adquirida) es un potente inhibidor de una HIV-1 proteasa necesaria para el crecimiento viral y la infección celular. Teniendo en cuenta la reacción catalizada por esta proteasa, indique una razón probable para que el Invirase sea un inhibidor tan efectivo.

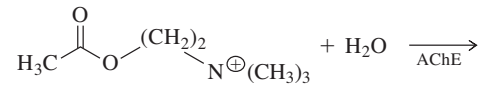


12. El derivado tetrasacárido que mostrado abajo es un potente inhibidor de la lisozima, porque se une 3 600 veces con más fuerza que el $(GlcNAc)_4$, un sustrato tetrasacárido. El anillo modificado adopta la conformación de media silla. Dibuje la forma de resonancia del derivado que se parece al estado de transición del oxocarbocatión en el mecanismo de la lisozima. ¿Por qué el derivado es un buen inhibidor de la lisozima?

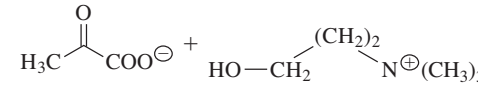


13. La dipeptidil peptidasa IV humana (DPP-IV) es una serina proteasa que cataliza la hidrólisis de enlaces prolil peptídicos en la penúltima posición, en el término N de una proteína. Muchos péptidos fisiológicos se han identificado como sustratos, incluyendo proteínas que participan en la regulación del metabolismo de la glucosa. La DDP-IV contiene una tríada catalítica en el sitio activo (Glu-His-Ser) y un residuo de tirosina en el agujero del oxianión. Se hizo una mutagénesis dirigida al sitio de este residuo de tirosina en DPP-IV y se comparó la capacidad de la enzima para escindir un sustrato de péptido con la de la enzima de tipo silvestre. El residuo de tirosina que hay en el agujero del oxianión fue cambiado por fenilalanina. El mutante de fenilalanina tuvo menos del 1% de la actividad de la enzima de tipo silvestre (Bjelke, J. R., Christensen, J., Branner, S., Wagtmann, N., Olsen, C., Kanstrup, A. B. y Rasmussen (2004). Tyrosine 547 constitutes an essential part of the catalytic mechanism of dipeptidyl peptidase IV. *J. Biol. Chem.* 279:34691-34697). ¿Se requiere esta tirosina para la actividad del DDP-IV? ¿Por qué la sustitución de una tirosina por una fenilalanina suprime la actividad enzimática?

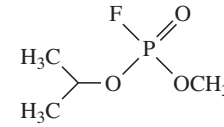
14. La acetilcolinesterasa (AChE) cataliza la descomposición de la acetilcolina, un neurotransmisor, en acetato y colina. Esta enzima contiene una tríada catalítica con los residuos His, Glu y Ser.



Acetilcolina



La tríada catalítica aumenta la nucleofilicidad del residuo de serina. El oxígeno nucleofílico de la serina ataca al carbono carbonilo de la acetilcolina para formar un intermedio tetraédrico.

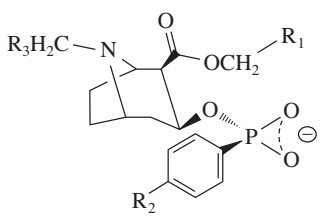


Sarín

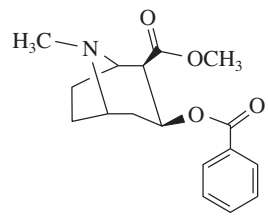
El gas Sarín, agente nervioso, es un inactivador extremadamente potente de la AChE. Es un inhibidor irreversible que modifica en forma covalente al residuo de serina en el sitio activo de la AChE.

a) Haga un diagrama del arreglo esperado de los aminoácidos en la tríada catalítica.
b) Proponga un mecanismo para la modificación covalente de la AChE debida al Sarín.

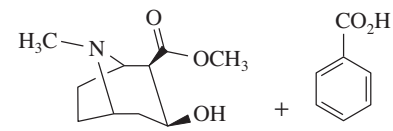
15. Los anticuerpos catalíticos son agentes terapéuticos potenciales para tratar sobredosis y adicción a las drogas. Por ejemplo, un anticuerpo catalítico que cataliza la descomposición de la cocaína antes de que llegue al cerebro sería un tratamiento efectivo de desintoxicación en el abuso de drogas y adicción a éstas. Se usó el análogo fosfonato que se muestra abajo, para formar un anticuerpo contra la cocaína que catalice la hidrólisis rápida de la cocaína. Explique por qué dicho fosfonato éster se eligió para producir un anticuerpo catalítico.



Análogo fosfonato



(–) - Cocaína



Metil éster de ecgonina

Ácido benzoico

16. En el enfisema crónico, enfermedad pulmonar, se degeneran los alveolos pulmonares, donde se intercambia el oxígeno del aire por dióxido de carbono en la sangre. La deficiencia del inhibidor α1-proteinasa es una condición genética que existe en ciertas familias, y se debe a mutaciones en aminoácidos críticos en la secuencia del inhibidor α1-proteinasa. Es más probable que los individuos con mutaciones desarrollen enfisema. El inhibidor α1-proteinasa se produce en el hígado y después circula en la sangre. Este inhibidor es una proteína, que es el principal inhibidor de la elastasa neutrófila, serina proteasa presente en los pulmones. La elastasa neutrófila rompe la proteína elastina, importante en la función pulmonar. Se cree que la mayor velocidad de descomposición de elastina en el tejido pulmonar es la que causa el enfisema. Un tratamiento para la deficiencia del inhibidor de α1-proteinasa es administrar al paciente ese inhibidor en forma silvestre (derivado de grandes aportaciones de plasma humano) en forma intravenosa, inyectando la proteína en forma directa al torrente sanguíneo.

a) Explique la lógica del tratamiento con inhibidor de α1-proteinasa de tipo silvestre.
b) Este tratamiento consiste en la administración intravenosa del inhibidor de α1-proteinasa de tipo silvestre. Explique por qué no puede tomarse este inhibidor por vía oral.

Lecturas seleccionadas

Generales

Abeles, R. H., Frey, P. A. y Jencks, W. P. (1992). *Biochemistry* (Boston: Jones and Bartlett). Este texto se enfoca hacia principios químicos en bioquímica, e incluye varios mecanismos enzimáticos detallados.

Fersht, A. (1995). *Enzyme Structure and Mechanism.* 2nd ed. (Nueva York: W. H. Freeman). Sigue siendo un clásico.

Enlazamiento y catálisis

Bartlett, G. J., Porter, C. T., Borkakoti, N. y Thornton, J. M. (2002). Analysis of catalytic residues in enzyme active sites. *J. Mol. Biol.* 324:105-121.

Hackney, D. D. (1990). Binding energy and catalysis. In *The Enzymes,* Vol. 19, 3rd ed., D. S. Sigman y P. D. Boyer, eds. (San Diego: Academic Press), pp. 1-36. La sección II de este artículo explica con claridad la interrelación entre enlazamiento y catálisis.

Jencks, W. P. (1987). Economics of enzyme catalysis. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 52:65-73. Resumen de las teorías de la catálisis enzimática.

Kraut, J. (1998). How do enzymes work? *Science* 242:533-540. Un repaso con fuerte énfasis hacia la estabilización del estado de transición.

Neet, K. E. (1998). Enzyme catalytic power minireview series. *J. Biol. Chem.* 273; 25527-25528, y trabajos relacionados en las páginas 25529-25532, 26257-26260 y 27035-27038. Descripciones de los mecanismos potenciales de estabilización del estado de transición.

Schiøtt, B., Iversen, B. B., Madsen, G. K. J., Larsen, F. K. y Bruice, T. C. (1998). On the electronic nature of low-barrier hydrogen bonds in enzymatic reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:12799-12802. Experimentos que demuestran la existencia de enlaces covalentes de hidrógeno en la benzoílacetona.

Shan, S.—U. y Herschlag, D. (1996). The change in hydrogen bond strength accompanying charge rearrangement: implications for enzymatic catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14474-14479. Pruebas químicas a favor de un gran fortalecimiento de puentes de hidrógeno en medios no acuosos, como sitios activos.

Análogos de estado de transición

Schramm, V. L. (1998). Enzymatic transition status and transition state analog design. *Annu. Rev. Biochem.* 67:693-720.

Wolfenden, R. y Radzicka, A. (1991). Transition-state analogues. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1:780-787.

Enzimas específicas

Cassidy, C. S., Lin., J. y Frey, P. A. (1997). A new concept for the mechanism of action of chymotrypsin: the role of the low-barrier hydrogen bond. *Biochemistry* 36:4576-4584.

Davies, G. J., Mackenzie, L., Varrot, A., Dauter, M., Brzozowski, A. M., Schülein, M. y Withers, S. G. (1998). Snapshots along an enzymatic reaction coordinate: analysis of a retaining β-glycoside hydrolase. *Biochemistry* 37:11707-11713. Estructuras de las formas E, ES, E-intermedio y EP de una celulasa mediante rayos X.

Dodson, G. y Wlodawer, A. (1998). Catalytic triads and their relatives. *Trends Biochem. Sci.* 23:347-352. Ser-His-Asp o una de sus variedades están en los sitios activos de muchas enzimas.

Frey, P. A., Whitt, S. A. y Tobin, J. B. (1994). A low-barrier hydrogen bond in the catalytic triad of serine proteases.. *Science* 264:1927-1930.

Getzoff, E. D., Cabelli, D. E., Fisher, C. L., Parge, H. E., Viezzoli, M. S., Banci, L. y Hallewell, R. A. (1992). Faster superoxide dismutase mutants designed by enhancing electrostatic guidance. *Nature* 358:347-351. Describe un ejemplo de un sustrato guiado a un sitio activo mediante un campo electrostático.

Harris, T. K., Abeygunawardana, C. y Mildvan, A. S. (1997). NMR studies of the role of hydrogen bonding in the mechanism of triosephosphate isomerase. *Biochemistry* 36:14661-14675. Propuesta de un mecanismo alternativo para la triosa fosfato isomerasa.

Huber, R. y Bode, W. (1978). Structural basis of the activation and action of trypsin. *Acc. Chem. Res.* 11:114-122.

Kirby, A. J. (2001). The lysozyme mechanism sorted - after 50 years. *Nature Struct. Biol.* 8:737-739.

Knowles, J. R. y Albery, W. J. (1977). Perfection in enzyme catalysis: the energetics of triosephosphate isomerase. *Acc. Chem. Res.* 10:105-111.

Lin, J., Cassidy, C. S. y Frey, P. A. (1998). Correlations of the basicity of His-57 with transition state analogue binding, substrate reactivity, and the strength of the low-barrier hydrogen bond in chymotrypsin. *Biochemistry* 37:11940-11948

Lodi, P. J. y Knowles, J. R. (1991). Neutral imidazole is the electrophile in the reaction catalyzed by triosephosphate isomerase: structural origins and catalytic implications. *Biochemistry* 30:6948-6956.

Paetzel, M. y Dalbey, R. E. (1997). Catalytic hydroxyl/amine dyads within serine proteases. *Trends Biochem. Sci.* 22:28-31. Novedosas serina proteasas tienen díadas Ser-Lys en sus centros catalíticos.

Perona, J. J. y Craik, C. S. (1997). Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold. *J. Biol. Chem.* 272:29987-29990. Más de 500 enzimas tienen el mismo mecanismo catalítico, pero distintas especificidades hacia sustratos.

Steitz, T. A. y Shulman, R. G. (1982). Crystallographic and NMR studies of the serine proteases. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 11:419-444.

Zhou, G., Somasundaram, T., Blanc, E., Parthasarathy, G., Ellington, W. R. y Chapman, M. S. (1998). Transition state structure of arginine kinase: implications for catalysis of bi-molecular reactions. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95:8449-8454.

7

capítulo siete

Coenzimas y vitaminas

La evolución ha producido un conjunto espectacular de proteínas catalizadoras, pero el repertorio catalítico de un organismo no se limita por la reactividad de grupos suministrados por los residuos de aminoácido en las enzimas. Hay otras especies químicas, llamadas cofactores, que participan con frecuencia en la catálisis. Las apoenzimas (sólo proteínas) inactivas requieren de los **cofactores** para convertirse en holoenzimas activas. Hay dos tipos de cofactores: los **iones esenciales** (principalmente iones metálicos) y los compuestos orgánicos llamados **coenzimas** (figura 7.1). Los cofactores, tanto inorgánicos como orgánicos, se transforman en partes esenciales de los sitios activos de ciertas enzimas.

Muchos de los minerales que necesitan todos los organismos son esenciales porque son cofactores. Algunos iones esenciales, llamados iones activadores, están unidos en forma reversible, y con frecuencia participan en el enlazamiento de los sustratos. En contraste, algunos cationes están fuertemente unidos, y a menudo participan en forma directa en reacciones catalíticas.

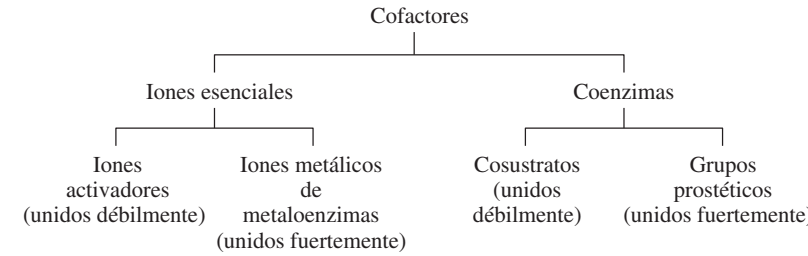


Figura 7.1 ▲
Tipos de cofactores. Los iones y las coenzimas esenciales se pueden distinguir además por la fuerza de la interacción con sus apoenzimas.

Arriba: Nicotinamida adenina dinucleótido ($NAD^{\oplus}$), coenzima derivada de la vitamina ácido nicotínico (niacina). El $NAD^{\oplus}$ es un agente oxidante. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

Las coenzimas funcionan como reactivos de transferencia de grupos. Son específicas para los grupos químicos que aceptan y donan. Para algunas coenzimas, el grupo es hidrógeno o un electrón; otras coenzimas transportan grupos químicos mayores, unidos en forma covalente. Estos grupos metabólicos móviles están unidos en el **centro reactivo** de la coenzima. (En las estructuras que se presentan en este capítulo, el grupo metabólico o el centro reactivo se muestra en gris oscuro). El estudio de las coenzimas se podrá simplificar concentrándose en las propiedades químicas de sus centros reactivos.

Este capítulo comenzará describiendo los cofactores de ion esencial. Gran parte del resto de este capítulo se dedica a los cofactores orgánicos más complejos. En los mamíferos, muchas de esas coenzimas se derivan de precursores alimenticios llamados vitaminas. En consecuencia, aquí se describirán las vitaminas. Se concluirá con un vistazo a algunas proteínas que son coenzimas. La mayor parte de las estructuras y reacciones que aquí se presentan se encontrarán en capítulos posteriores, cuando se describan vías metabólicas particulares.

7.1 Muchas enzimas requieren cationes inorgánicos

Más de la cuarta parte de todas las enzimas conocidas requieren cationes metálicos para tener actividad catalítica total. Estas enzimas se pueden dividir en dos grupos: enzimas activadas por metal y metaloenzimas. Las **enzimas activadas por metal** tienen necesidad absoluta de iones metálicos adicionales, o son estimuladas por adición de iones metálicos. Algunas de esas enzimas requieren cationes monovalentes, como $K^{\oplus}$, y otras necesitan cationes divalentes, como Ca^{2+} o Mg^{2+}. Por ejemplo, las cinasas requieren iones magnesio para el complejo magnesio-ATP que usan como el sustrato donador de grupo fosforilo. El magnesio protege a los grupos fosfato, con carga negativa, del ATP, y los hace más susceptible al ataque nucleofílico (sección 10.6). Las **metaloenzimas** contienen iones metálicos firmemente unidos en sus sitios activos. Los iones que más se suelen encontrar en las metaloenzimas son de metales de transición como hierro y zinc, y con menos frecuencia cobre y cobalto.

Los iones metálicos que se unen fuertemente a las enzimas con frecuencia tienen funciones predominantes en la catálisis. Los iones de algunas metaloenzimas pueden funcionar como catalizadores electrofílicos. Al atraer electrones, los iones metálicos pueden polarizar los enlaces. Por ejemplo, el cofactor de la enzima anhidrasa carbónica es un átomo electrofílico de zinc unido a las cadenas laterales de tres residuos de histidina y a una molécula de agua. La unión con Zn^{2+} hace que el agua se ionice con más facilidad. Un grupo carboxilato básico de la enzima elimina a un protón de la molécula de agua enlazada y produce un ion hidróxido nucleofílico, que ataca al sustrato (figura 7.2). Esta enzima tiene una velocidad catalítica muy alta, en parte debido a la simplicidad de su mecanismo. Muchas otras metaloenzimas de zinc activan a las moléculas enlazadas de agua de esta manera.

Los iones de otras metaloenzimas pueden tener reacciones reversibles de oxidación y reducción, al transferir electrones de un sustrato reducido a un sustrato oxidado. Por ejemplo, el hierro es parte del grupo hemo de la catalasa, enzima que cataliza la degradación del H_2O_2. También hay grupos hemo similares en los citocromos, que son proteínas de transferencia de electrones, que se encuentran asociadas a metaloenzimas específicas en mitocondrias y cloroplastos. Con frecuencia se encuentra hierro, no de hemo, en las metaloenzimas en forma de grupos de hierro-azufre (figura 7.3). Los grupos hierro-azufre más comunes son [2 Fe–2 S] y [4 Fe–4 S], en los que los átomos de hierro están acomplejados con igual cantidad de iones sulfuro del H_2S y de grupos $—S^{\ominus}$ de residuos de cisteína. Los grupos hierro-azufre intermedian algunas reacciones de oxidación-reducción. Cada grupo, contenga dos o cuatro átomos de hierro, sólo puede aceptar un electrón en una reacción de oxidación.

7.2 Clasificación de las coenzimas

Se puede clasificar a las coenzimas en dos tipos, según la forma en que interactúan con la apoenzima (figura 7.1). Las coenzimas de un tipo, llamadas **cosustratos**, con frecuencia

Vea la tabla de los elementos esenciales en la figura 1.1.

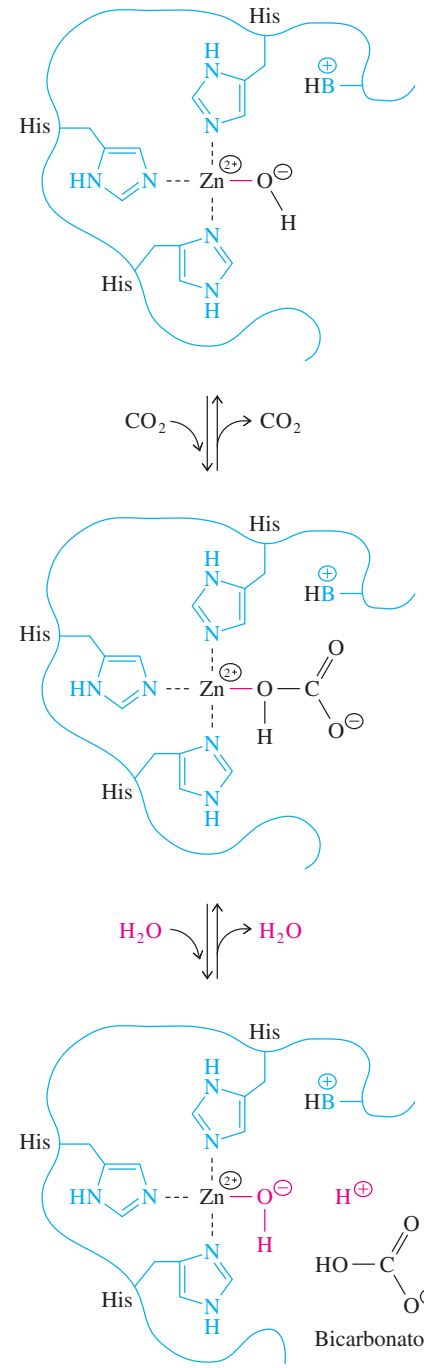


Figura 7.2 ▲
Mecanismo de la anhidrasa carbónica. El ion zinc en el sitio activo promueve la ionización de una molécula de agua enlazada. El ion hidróxido que resulta ataca al átomo de carbono en el dióxido de carbono, y produce bicarbonato, que es liberado de la enzima.

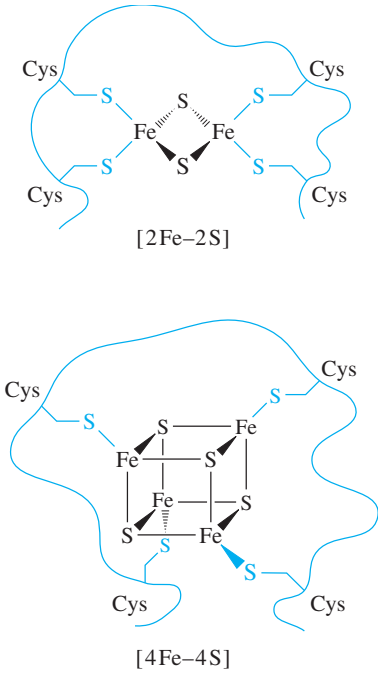


Figura 7.3 ▲
Grupos hierro-azufre. En cada tipo de grupo hierro-azufre, los átomos de hierro forman complejo con igual cantidad de iones sulfuro (S^{2-}) y con los grupos tiolato de las cadenas laterales de residuos de cisteína.

Consulte la sección 4.12 para la estructura del hemo

En la sección 7.16 se comentarán los citocromos

TABLA 7.1 Algunas vitaminas y sus enfermedades relacionadas por deficiencia en la dieta

Vitamina	Enfermedad
Ascorbato (C)	Escorbuto
Niacina	Pelagra
Riboflavina (B_2)	Retardo del crecimiento
Pantotenato (B_5)	Dermatitis en pollos
Tiamina (B_1)	Beriberi
Piridoxal (B_6)	Dermatitis en ratas
Biotina	Dermatitis en humanos
Folato	Anemia
Cobalamina (B_{12})	Anemia perniciosa

en realidad son sustratos en reacciones catalizadas por enzimas. Un cosustrato se altera durante la reacción y se disocia del sitio activo. La estructura original del cosustrato se regenera en una reacción posterior, catalizada por otra enzima. El cosustrato se recicla en forma repetida dentro de la célula, a diferencia de un sustrato ordinario, cuyo producto, en el caso típico, sufre una transformación posterior. Los cosustratos llevan y traen grupos metabólicos entre distintas reacciones catalizadas por enzimas.

El segundo tipo de coenzima se llama **grupo prostético.** Un grupo prostético permanece unido a la enzima durante la reacción. En algunos casos, el grupo prostético se une en forma covalente a su apoenzima, en tanto que en otros casos está firmemente unido al sitio activo por muchas interacciones débiles. Igual que los residuos iónicos de aminoácido del sitio activo, un grupo prostético debe regresar a su forma original durante cada evento catalítico total, o la holoenzima no seguirá siendo catalíticamente activa. Los cosustratos y los grupos prostéticos son parte del sitio activo de las enzimas. Suministran grupos reactivos que no están disponibles en las cadenas laterales de los residuos de aminoácido.

Cada especie viviente usa coenzimas en una cantidad variada de reacciones importantes catalizadas por enzimas. La mayor parte de esas especies son capaces de sintetizar sus coenzimas a partir de precursores simples. Esto es válido en especial en cuatro de los cinco reinos: procariotas, protistas, hongos y plantas. Los animales, en general, han perdido la capacidad de sintetizar algunas coenzimas. Los mamíferos (incluyendo los humanos) necesitan una fuente de coenzimas, o de sus precursores inmediatos, para sobrevivir. Son suministradas por los nutrientes, por lo regular en pequeñas cantidades (microgramos o miligramos por día). Estos compuestos esenciales se llaman vitaminas. Los mamíferos y otros animales se basan en que otros organismos les suministren esos micronutrientes. Las fuentes originales de vitaminas suelen ser plantas y microorganismos, aunque los animales carnívoros pueden obtener vitaminas de la carne. La mayor parte de las vitaminas deben transferirse, en forma enzimática, a sus coenzimas correspondientes.

Puede sobrevenir una enfermedad por deficiencia nutricional cuando una vitamina es deficiente o está ausente en la dieta de un animal. Las enfermedades por deficiencia nutricional pueden remediarse o evitarse consumiendo la vitamina adecuada. La recuperación de esas enfermedades se ha usado para probar la potencia de extractos durante el aislamiento de las vitaminas. (Otra prueba consiste en medir el crecimiento de microorganismos con mutaciones en sus rutas de biosíntesis). La tabla 7.1 es una lista de nueve vitaminas, y las enfermedades asociadas con sus deficiencias. Cada una de esas vitaminas y sus funciones en el metabolismo se describirán a continuación. La mayor parte de ellas se convierten en coenzimas, a veces después de una reacción con ATP. La parte de la molécula de ATP que es transferida a la vitamina es un grupo que enlaza a la coenzima con los sitios activos de las enzimas.

La palabra *vitamina* fue acuñada por Casimir Funk en 1912 para describir una "amina vital" de los hollejos del arroz, que curaba el beriberi, una enfermedad por deficiencia nutricional que causa degeneración neural. El beriberi fue descrito primero en los pájaros, y después en humanos cuyas dietas consistían principalmente en arroz limpio (pulido). La sustancia anti-beriberi (tiamina) se conoció como vitamina B_1. Desde entonces se han identificado dos amplias clases de vitaminas: las hidrosolubles (como las vitaminas B) y las liposolubles (llamadas también vitaminas lípidas). Aunque se demostró que muchas vitaminas son todo menos que aminas, se ha conservado el término *vitamina.* Las vitaminas hidrosolubles (solubles en agua) se requieren diariamente en pequeñas cantidades, porque son excretadas con facilidad en la orina y los almacenamientos celulares de sus coenzimas son inestables. Al revés, las vitaminas lípidas (solubles en grasas y aceites) como las vitaminas A, D, E y K, son almacenadas por los animales, y su ingestión exagerada puede causar estados de toxicidad llamados hipervitaminosis.

Las coenzimas más comunes se muestran en la tabla 7.2, junto con su papel metabólico y su fuente vitamínica. En las secciones siguientes se describirán las estructuras y las funciones de esas coenzimas comunes.

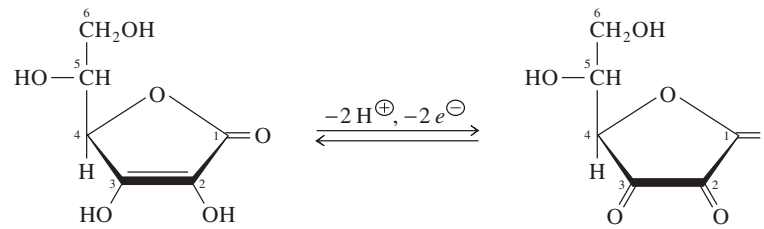
TABLA 7.2 Principales coenzimas

Coenzima	Fuente vitamínica	Principales funciones metabólicas	Función mecanicista
Trifosfato de adenosina (ATP)	—	Transferencia de grupos fosforilo o nucleotidilo	Cosustrato
S-Adenosilmetionina	—	Transferencia de grupos metilo	Cosustrato
Uridina difosfato glucosa	—	Transferencia de grupos glicosilo	Cosustrato
Nicotinamida adenina dinucleótido ($NAD^{\oplus}$) y fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido ($NADP^{\oplus}$)	Niacina	Reacciones de oxidación-reducción donde haya dos transferencias de electrón	Cosustrato
Flavina mononucleótido (FMN) y flavina adenina dinucleótido (FAD)	Riboflavina (B_2)	Reacciones de oxidación-reducción donde haya una o dos transferencias de electrón	Grupo prostético
Coenzima A (CoA)	Pantotenato (B_5)	Transferencia de grupos acilo	Cosustrato
Pirofosfato de tiamina (TPP)	Tiamina (B_1)	Transferencia de fragmentos de dos carbonos que contengan un grupo carbonilo	Grupo prostético
Fosfato de piridoxal (PLP)	Piridoxina (B_6)	Transferencia de grupos desde aminoácidos y hacia éstos	Grupo prostético
Biotina	Biotina	Carboxilación de sustratos dependiente de ATP, o transferencia de grupo carboxilo entre sustratos	Grupo prostético
Tetrahidrofolato	Folato	Transferencia de sustituyentes con un carbono, en especial los grupos formilo e hidroximetilo; suministra el grupo metilo para la timina en el ADN	Cosustrato
Adenosilcobalamina	Cobalamina (B_{12})	Reorganizaciones intramoleculares	Grupo prostético
Metilcobalamina	Cobalamina (B_{12})	Transferencia de grupos metilo	Grupo prostético
Lipoamida	—	Oxidación de un grupo hidroxiacilo del TPP y después transferencia como grupo acilo	Grupo prostético
Retinal	Vitamina A	Visión	Grupo prostético
Vitamina K	Vitamina K	Carboxilación de algunos residuos de glutamato	Grupo prostético
Ubiquinona (Q)	—	Portador de electrones soluble en lípidos	Cosustrato

RECUADRO 7.1 Vitamina C: es vitamina, pero no es coenzima

La vitamina más simple es el ácido ascórbico (vitamina C), agente contra el escorbuto (sección 8.4F). La relación entre el escorbuto y la nutrición se reconoció hace cuatro siglos, cuando los médicos de la armada británica descubrieron que los jugos de cítricos eran un remedio contra el escorbuto en marinos cuya dieta carecía de frutas y verduras frescas. Sin embargo, no fue sino hasta 1930 que se aisló el ácido ascórbico, y se demostró que es el componente dietético esencial que contienen los jugos de cítricos. El ácido ascórbico, un carbohidrato, es una lactona, un éster interno en el que el grupo carboxilato del C-1 está condensado con el grupo hidroxilo del C-4, formando una estructura anular. Ahora sabemos que el ácido ascórbico no es una coenzima, sino que actúa como un agente reductor durante la hidroxilación de la colágena (sección 4.11). Aunque la mayoría de los animales pueden sintetizar el ácido ascórbico durante el metabolismo de carbohidratos, los cobayos y los primates (incluyendo a los humanos) carecen de esta capacidad, y en consecuencia deben suplirla con fuentes dietéticas.

▶ Ácido ascórbico (vitamina C) y su forma dehidro, o forma oxidada, es



Ácido ascórbico — Ácido dehidroascórbico

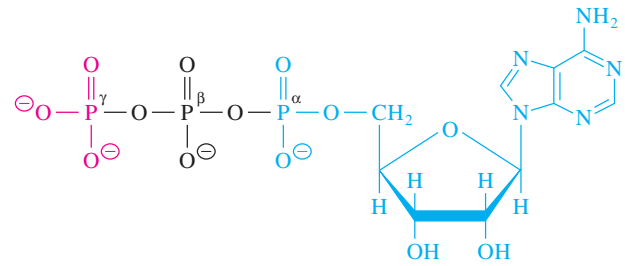


Figura 7.4 ▶
ATP. La adenina, base nitrogenada, está unida a una ribosa que tiene tres grupos fosforilo. La transferencia de un grupo fosforilo (gris oscuro) genera ADP, y la transferencia de un grupo nucleotidilo (AMP, gris claro) genera pirofosfato.

7.3 ATP y otros cosustratos nucleótidos

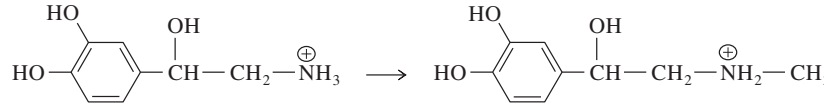
Hay varios trifosfatos nucleósidos que son coenzimas. Con mucho, el más abundante es el trifosfato de adenosina (ATP, *adenosine triphosphate*). Entre otros ejemplos frecuentes están el GTP, la *S*-adenosilmetionina y azúcares nucleótido, como la difosfato de uridina glucosa (UDP-glucosa). El ATP (figura 7.4) es un reactivo versátil que puede donar sus grupos fosforilo, pirofosforilo, adenililo (AMP) o adenosilo en reacciones de transferencia de grupo.

La reacción más común donde interviene el ATP es la transferencia del grupo fosforilo. Por ejemplo, en reacciones catalizadas por cinasas, el grupo γ-fosforil del ATP se transfiere a un nucleófilo y queda ADP. La segunda reacción más común es la transferencia del grupo nucleotidilo (transferencia de la mitad de AMP), dejando pirofosfato (PP_i). El ATP tiene una función central en el metabolismo. Su papel como cofactor de alta energía se describe con más detalle en el capítulo 10 (introducción al metabolismo).

El ATP también es la fuente de otras coenzimas metabólicas. Una es la *S*-adenosilmetionina (figura 7.5), y es sintetizada por la reacción de metionina con ATP.

$$\text{Metionina} + \text{ATP} \rightarrow \textit{S}\text{-Adenosilmetionina} + P_i + PP_i \qquad \textbf{(7.1)}$$

A diferencia del grupo tiometilo de la metionina, el sulfonio con carga positiva de la S-adenosilmetionina es muy reactivo. La *S*-adenosilmetionina reacciona con facilidad con aceptores nucleofílicos, y es el donador de casi todos los grupos metilo que se usan en reacciones de biosíntesis. Por ejemplo, se requiere para la conversión de la hormona norepinefrina a epinefrina.



Norepinefrina Epinefrina **(7.2)**

Entre las reacciones de metilación que requieren *S*-adenosilmetionina están la metilación de fosfolípidos, proteínas, ADN y ARN. En las plantas, la *S*-adenosilmetionina, como precursor del etileno, una hormona vegetal, interviene en la regulación de la maduración de las frutas.

Las coenzimas de azúcar nucleótido intervienen en el metabolismo de carbohidratos. El azúcar nucleótido más común es la difosfato de uridina glucosa (UDP-glucosa) y se forma en la reacción del 1-fosfato de glucosa con trifosfato de uridina (UTP), un trifosfato nucleósido en el que la adenina del ATP es reemplazada por una mitad de uracilo (figura 7.6). La UDP-glucosa puede donar su grupo glicosido (que se muestra en gris oscuro) a un aceptor adecuado, y libera UDP. La UDP-glucosa se regenera cuando el UDP acepta a un grupo fosforilo del ATP, y el UTP que resulta reacciona con otra molécula de 1-fosfato de glucosa.

Pueden variar tanto el azúcar como el nucleósido de las coenzimas nucleótido-azúcar. Por ejemplo, se encontrarán derivados del nucleósido difosfato de citidina (CDP, de *cytidine diphosphate*), que tiene citosina como base nitrogenada, en el metabolismo de los lípidos (secciones 16.9 y 16.10).

La estructura y la química de los nucleótidos se describen con más detalle en el capítulo 19.

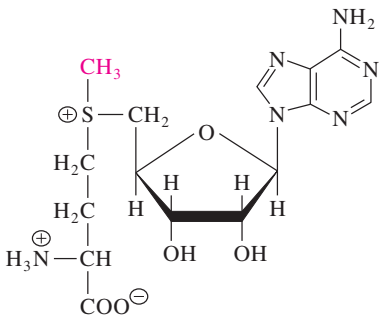
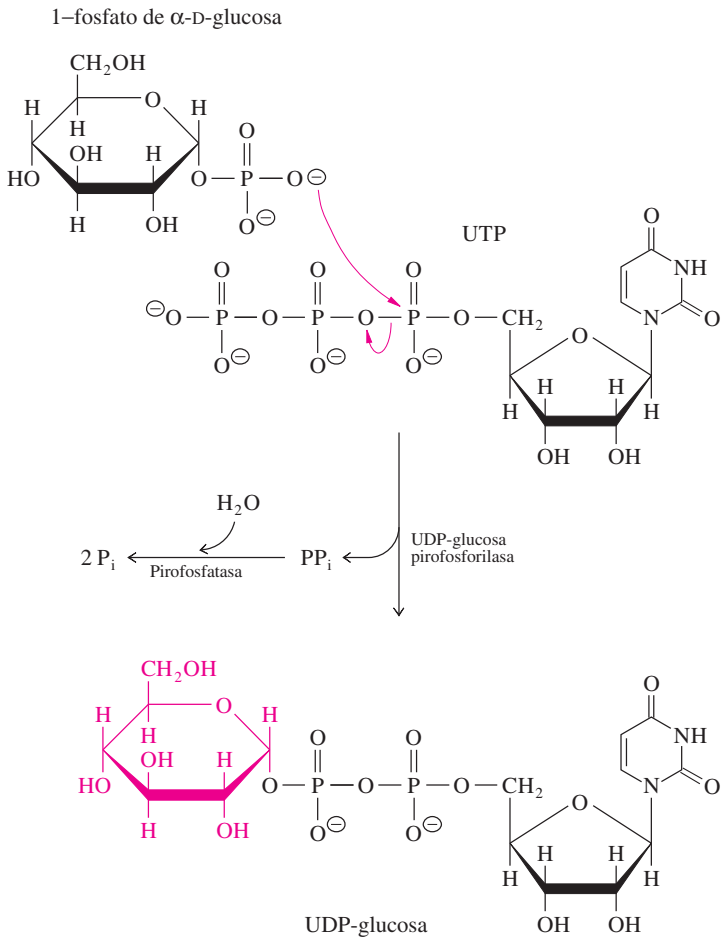


Figura 7.5 ▲
S-Adenosilmetionina. El grupo metilo activado de esta coenzima se indica en gris oscuro.



◀ Figura 7.6
Formación de UDP-glucosa catalizada por UDP-glucosa pirofosforilasa. Un oxígeno del grupo fosfato del 1-fosfato de αD-glucosa ataca al fósforo α del UTP. El PP_i liberado se hidroliza rápidamente a $2P_i$ por acción de la pirofosfatasa. Esta hidrólisis ayuda a impulsar la reacción catalizada por pirofosforilasa hacia su terminación. El móvil grupo glicosilo de la UDP-glucosa se indica en gris oscuro.

7.4 NAD⊕ y NADP⊕

Las coenzimas de nicotinamida son nicotinamida adenina dinucleótido ($NAD^⊕$) y el fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido ($NADP^⊕$), muy relacionado. Fueron las primeras coenzimas que se conocieron. Ambas contienen nicotinamida, la amida del ácido nicotínico (figura 7.7). El ácido nicotínico (llamado también niacina) es el factor que falta en la pelagra. Es esencial como precursor de $NAD^⊕$ y $NADP^⊕$. (En muchas especies, el triptófano se degrada a ácido nicotínico. En consecuencia, el triptófano en la dieta puede suplir algo de los requisitos de niacina o nicotinamida). Como el ácido nicotínico es el derivado de piridina con 3-carboxilo, con frecuencia se llaman coenzimas nucleótidos de piridina a las coenzimas de nicotinamida.

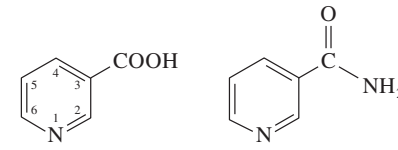


Figura 7.7 ▲
Ácido nicotínico (niacina) y nicotinamida.

Las coenzimas de nicotinamida participan en muchas reacciones de oxidación-reducción. Ayudan en la transferencia de electrones hacia metabolitos y desde éstos. Las formas oxidadas, $NAD^⊕$ y $NADP^⊕$, carecen de electrones, y las formas reducidas, NADH y NADPH, tienen un par adicional de electrones en forma de un ion hidruro unido en forma covalente. Las estructuras de estas coenzimas se ven en la figura 7.8. Las dos coenzimas contienen un enlace fosfoanhídrido que une dos 5′-nucleotidos: AMP y el ribonucleótido de la nicotinamida, llamado nicotinamida monucleótido (NMN) (formado a partir del ácido nicotínico). En el caso del NADP, hay un grupo fosforilo en el átomo de oxígeno 2′ del adenilato.

Nótese que el signo "+" en el $NAD^⊕$ sólo indica que el átomo de nitrógeno tiene una carga positiva. Eso no quiere decir que toda la molécula tenga un ion con carga positiva; de hecho, tiene carga negativa debido a los fosfatos. En el caso normal, un átomo de nitrógeno tiene siete protones y siete electrones. La capa externa tiene cinco electrones

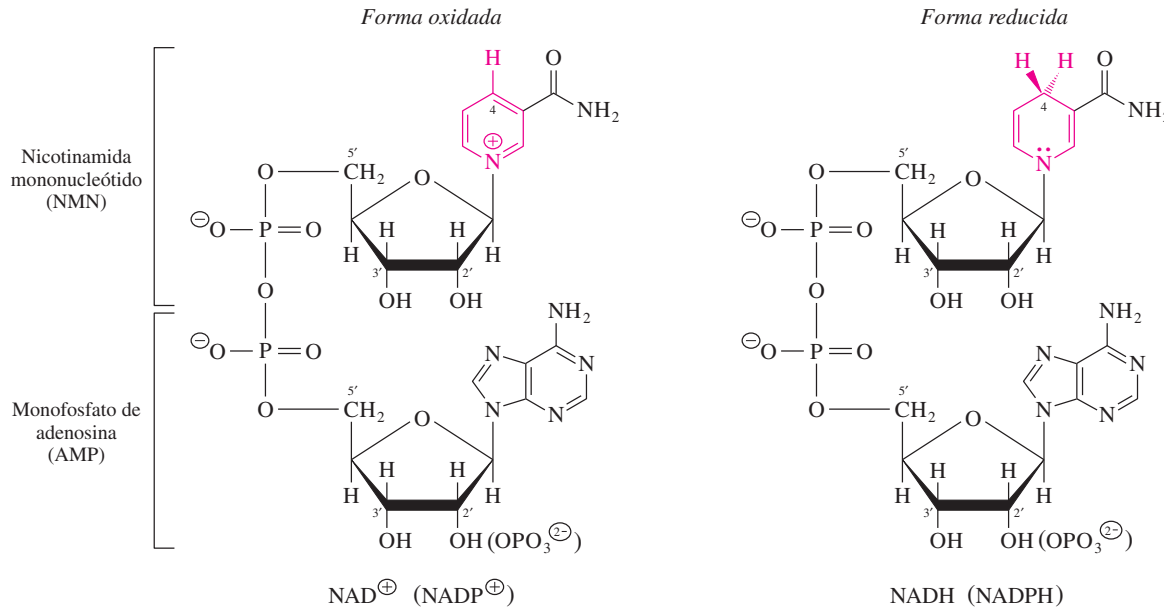


Figura 7.8 ▲
Formas oxidada y reducida de NAD (y de NADP). El anillo de piridina de la $NAD^{\oplus}$ se reduce por la adición de un ion hidruro al C-4 cuando la $NAD^{\oplus}$ se convierte en NADH (y cuando el $NADP^{\oplus}$ se convierte en NADPH). En el $NADP^{\oplus}$, se fosforila el grupo 2′-hidroxilo del anillo de azúcar en la adenosina. El centro reactivo de estas coenzimas se muestra en gris oscuro.

que pueden participar en la formación de enlaces. En la forma oxidada de la coenzima ($NAD^{\oplus}$ y $NADP^{\oplus}$), al nitrógeno de la nicotinamida le falta uno de sus electrones. Sólo tiene cuatro electrones en la capa externa, y están compartidos con átomos adyacentes de carbono para formar un total de cuatro enlaces covalentes. (Cada enlace tiene un par de electrones, de modo que la capa externa del átomo de nitrógeno está llena con ocho electrones compartidos). Es la causa de que la carga positiva se asocie normalmente al átomo de nitrógeno del anillo, como se ve en la figura 7.8. De hecho, la carga está distribuida sobre todo el anillo aromático.

En la forma reducida, el anillo aromático tiene su complemento de electrones normal y completo. En particular, el átomo de nitrógeno tiene cinco electrones en su capa externa. Dos de ellos (representados con puntos en la figura 7.8) son un par libre de electrones. Los otros tres electrones participan en tres enlaces covalentes.

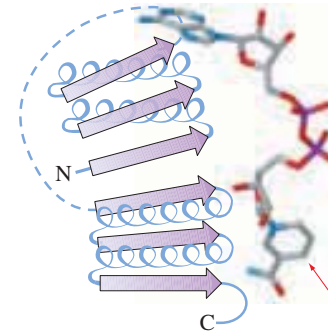
Casi siempre, el $NAD^{\oplus}$ y el $NADP^{\oplus}$ actúan como cosustratos para deshidrogenasas. Las deshidrogenasas dependientes de nucleótidos de piridina catalizan la oxidación de sus sustratos, transfiriendo dos electrones y un protón en forma de un ion hidruro ($H^{\ominus}$) al C-4 del grupo nicotinamida del $NAD^{\oplus}$ o $NADP^{\oplus}$. Eso genera las formas reducidas, NADH o NADPH, donde se ha formado un nuevo enlace C—H en el C-4 (un par de electrones) y el electrón que antes estaba asociado al doble enlace del anillo se ha deslocalizado al átomo de nitrógeno del anillo. Así, la oxidación por nucleótidos de piridina (o la reducción, la reacción inversa) siempre se efectúa de dos en dos electrones.

Se dice que el NADH y el NADPH, que son estables en soluciones que contienen oxígeno, tienen poder reductor (es decir, son reductores biológicos). La estabilidad de los nucleótidos de piridina reducidos les permite llevar su poder reductor de una enzima a otra, propiedad que no comparten las coenzimas derivadas de riboflavina (sección 7.5). La mayor parte de las reacciones que forman NADH y NADPH son catabólicas. La oxidación de NADH en las mitocondrias está acoplada a la síntesis del ATP. La mayor parte del NADPH se usa como agente reductor en reacciones de biosíntesis.

RECUADRO 7.2 Enlazamiento de NAD a las deshidrogenasas

En la década de 1970 se determinaron estructuras de cuatro deshidrogenasas dependientes de NAD: lactato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. Cada una de estas enzimas es oligómera, con una longitud aproximada de cadena de 350 residuos de aminoácido. Estas cadenas se pliegan y forman dos dominios distintos: uno que se une a la coenzima y otro que se une al sustrato específico. Para cada enzima el sitio activo es la hendidura entre los dos dominios.

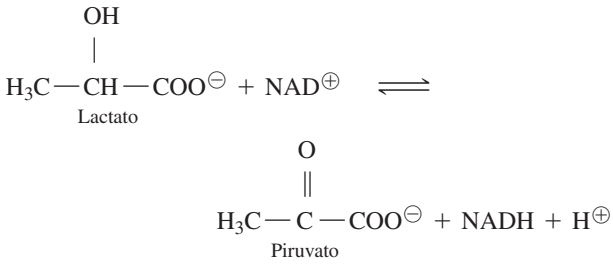
A medida que se determinaron las estructuras de más deshidrogenasas, se han observado varias conformaciones del motivo enlazante de coenzima. Muchas de ellas tienen estructuras enlazantes de NAD o NADP que consisten en un par de motivos $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ llamados pliegues de Rossmann, por Michael Rossmann, primero en observarlos en proteínas enlazantes con nucleótido (véase la figura). Cada uno de los motivos Rossmann de pliegue se une a una mitad del dinucleótido NAD⊕. Todas estas enzimas se unen a la coenzima con la misma orientación y en una conformación similar extendida. (Compárese la conformación del NAD⊕ cuando está unido a una proteína, con la conformación de solución que se ve en la primera página de este capítulo).



▲ Región enlazante NAD de algunas deshidrogenasas. La coenzima se une en una conformación extendida mediante la interacción con dos motivos $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ lado a lado, conocidos como pliegues de Rossmann. Los motivos de proteína extendida forman una hoja-β de seis cintas β-paralelas. La flecha indica el sitio donde se añade un ion híbrido al C-4 del grupo nicotinamida.

NADH y NADPH tienen un máximo de absorción ultravioleta a 340 nm, debido al anillo de dihidropiridina, en tanto que NAD⊕ y NADP⊕ no absorben luz de esa longitud de onda. La aparición y la desaparición de absorción a 340 nm se aprovechan para medir las velocidades de reacciones de oxidación y reducción relacionadas con los nucleótidos de piridina.

La lactato deshidrogenasa es una oxidorreductasa que cataliza la oxidación reversible de lactato. La enzima es una deshidrogenasa típica dependiente de NAD. El lactato libera un protón cuando se reduce el NAD⊕.



(7.3)

La figura 7.9 muestra cómo participan la enzima y la coenzima en la oxidación de lactato a piruvato, catalizada por la lactato deshidrogenasa. En este mecanismo, la coenzima acepta un ion hidruro en el C-4 del grupo nicotinamida. Eso produce una reorganización de enlaces en el anillo cuando se corren los electrones hacia el átomo de nitrógeno con carga positiva. La enzima suministra un catalizador ácido-base, y también los sitios de unión para la coenzima y para el sustrato. Nótese que se eliminan dos hidrógenos del lactato para producir piruvato (reacción 7.3). Uno de esos hidrógenos se transfiere al NAD⊕ como ion hidruro, llevando dos electrones, y el otro se transfiere a la His-195 como protón. El segundo hidrógeno se libera después como H⊕ para regenerar el catalizador básico (His-195). Hay muchos ejemplos de reacciones que dependen del NAD, donde la reducción del NAD⊕ se acompaña con la liberación de un protón, por lo que es muy común ver NADH + H⊕ en un lado de la ecuación.

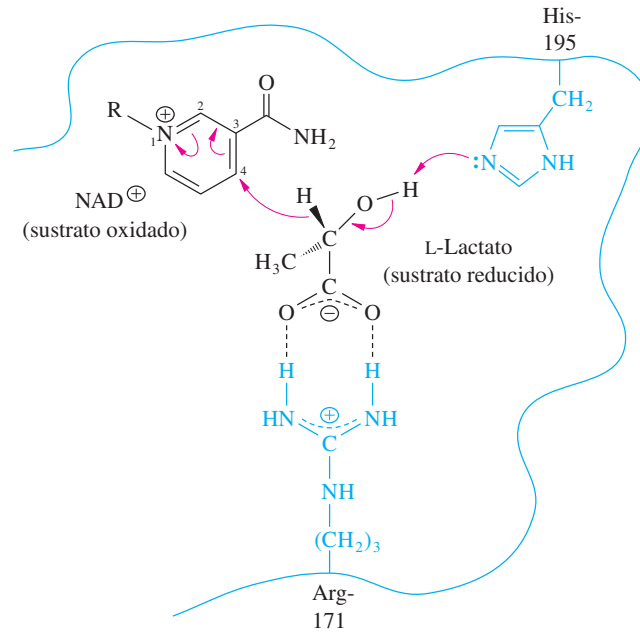


Figura 7.9 ▶
Mecanismo de la lactato deshidrogenasa. His-195, un catalizador básico en el sitio activo, sustrae un protón del grupo hidróxido en el C-2 del lactato, facilitando la transferencia del ion hidruro ($H^{\ominus}$) del C-2 del sustrato al C-4 del $NAD^{\oplus}$ enlazado. Arg-171 forma un par de iones con el grupo carboxilato del sustrato. En la reacción inversa se transfiere un $H^{\ominus}$ de la coenzima reducida, NADH, al C-2 del sustrato, el piruvato.

7.5 FAD y FMN

Las coenzimas flavina adenina dinucleótido (FAD) y flavina mononucleótido (FMN) se derivan de la riboflavina o vitamina B_2. La riboflavina es sintetizada por bacterias, protistas, hongos, plantas y algunos animales. Los mamíferos obtienen riboflavina de su alimento. La riboflavina está formada por ribitol, un alcohol con cinco carbonos unido al átomo N-10 de un sistema de anillo heterocíclico llamado isoaloxazina (figura 7.10a). Las coenzimas derivadas de la riboflavina se ven en la figura 7.10b. Igual que el $NAD^{\oplus}$ y el $NADP^{\oplus}$, el FAD contiene AMP y un enlace de pirofosfato.

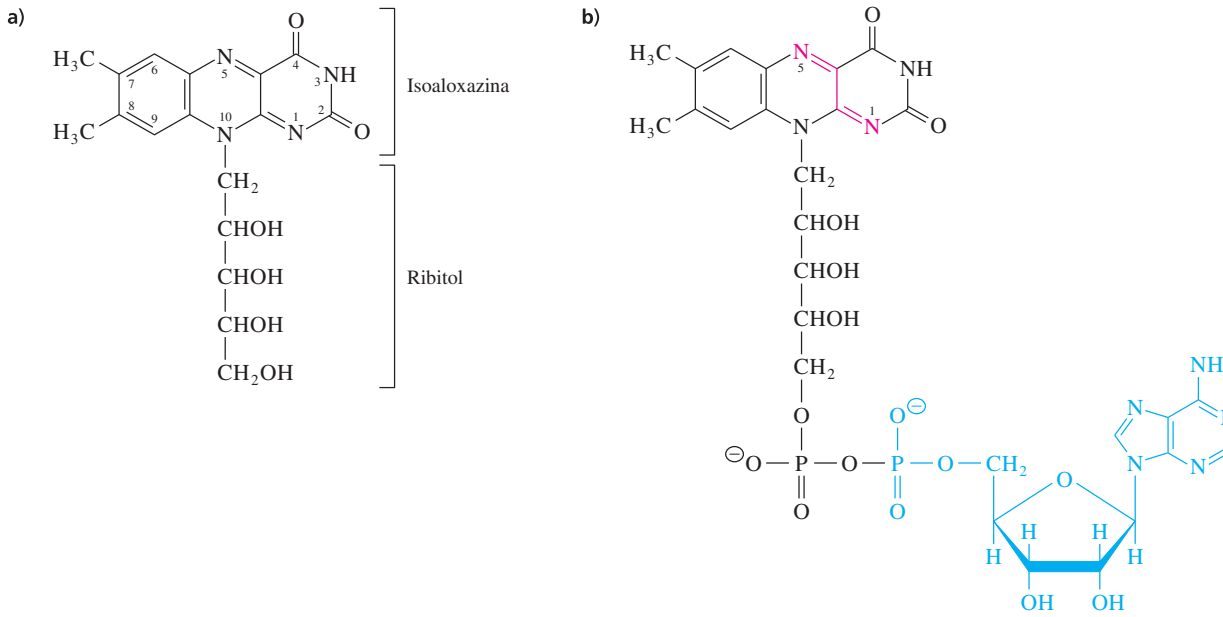
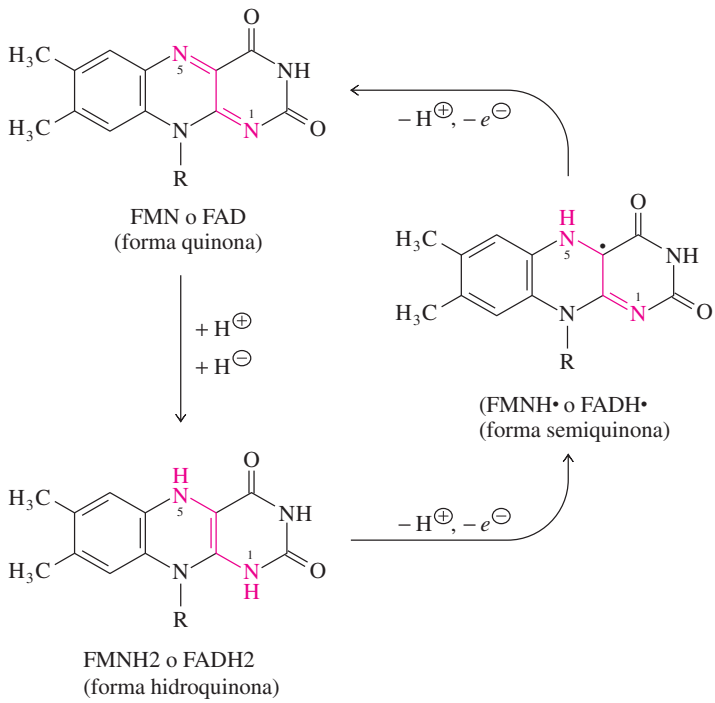


Figura 7.10 ▲
Riboflavina y sus coenzimas. **a)** Riboflavina. El ribitol está unido al sistema anular de isoaloxazina. **b)** Flavina mononucleótido (FMN, negro) y flavina adenina dinucleótido (FAD, negro y gris claro). El centro reactivo se muestra en gris oscuro.



◀ Figura 7.11
Reducción y reoxidación de FMN o FAD. Los dobles enlaces conjugados entre el N-1 y el N-5 se reducen por adición de un ion hidruro y un protón para formar $FMNH_2$ o $FADH_2$, respectivamente, que son las formas hidroquinona de cada coenzima. La oxidación se hace en dos pasos. Un solo electrón es eliminado por un agente oxidante de un electrón, con pérdida de un protón, para formar un radical libre relativamente estable. A continuación esta semiquinona se oxida por eliminación de un protón y un electrón para formar FMN o FAD totalmente oxidados.

Muchas oxidorreductasas requieren FAD o FMN como grupo prostético. A esas enzimas se les llama flavoenzimas o flavoproteínas. El grupo prostético está unido muy firmemente, casi siempre en forma no covalente. Las coenzimas de flavina reducida se pueden oxidar rápidamente en presencia de oxígeno. Como están firmemente unidas al grupo prostético, las apoenzimas protegen a las formas reducidas contra la reoxidación, que sería un desperdicio.

El FAD y FMN se reducen a $FADH_2$ y $FMNH_2$, tomando un protón y dos electrones en forma de un ion hidruro (figura 7.11). Las enzimas oxidadas son amarillo brillante, como resultado del sistema de doble enlace conjugado del sistema anular de isoaloxazina. El color se pierde cuando las coenzimas se reducen a $FMNH_2$ y $FADH_2$. A diferencia de la NADH y NADPH, que participan sólo en la transferencia de dos electrones, las $FMNH_2$ y $FADH_2$ donan electrones, uno por uno, o dos al mismo tiempo. El compuesto FADH• o FMNH•, parcialmente oxidado, se forma cuando se dona un electrón. Estos intermediarios son radicales libres relativamente estables, llamados semiquinonas. La oxidación de $FADH_2$ y $FMNH_2$ con frecuencia se acopla a la reducción de una metaloproteína que contiene Fe^{3+} (en un grupo [Fe — S]. Ya que un grupo de hierro-azufre sólo puede aceptar un electrón, se debe oxidar la flavina reducida en dos pasos, de un electrón cada uno, pasando por la semiquinona. Es importante la capacidad de la FMN para acoplar la transferencia de dos electrones con la transferencia de un electrón en muchos sistemas de transferencia electrónica.

7.6 Coenzima A

Muchos procesos metabólicos dependen de la coenzima A (CoA o HS-CoA), como la oxidación de moléculas de combustible y la biosíntesis de algunos carbohidratos y lípidos. Esta coenzima interviene en reacciones de transferencia de grupo acilo, donde los grupos metabólicos móviles son ácidos carboxílicos y ácidos grasos simples. La coenzima A tiene dos componentes principales: una unidad de 2-mercaptoetilamina, que tiene un grupo —SH libre, la vitamina pantotenato— (vitamina B_5, una amida de β-alanina y pantoato), y una mitad de ADP, cuyo grupo hidroxilo 3′ está esterificado con un tercer

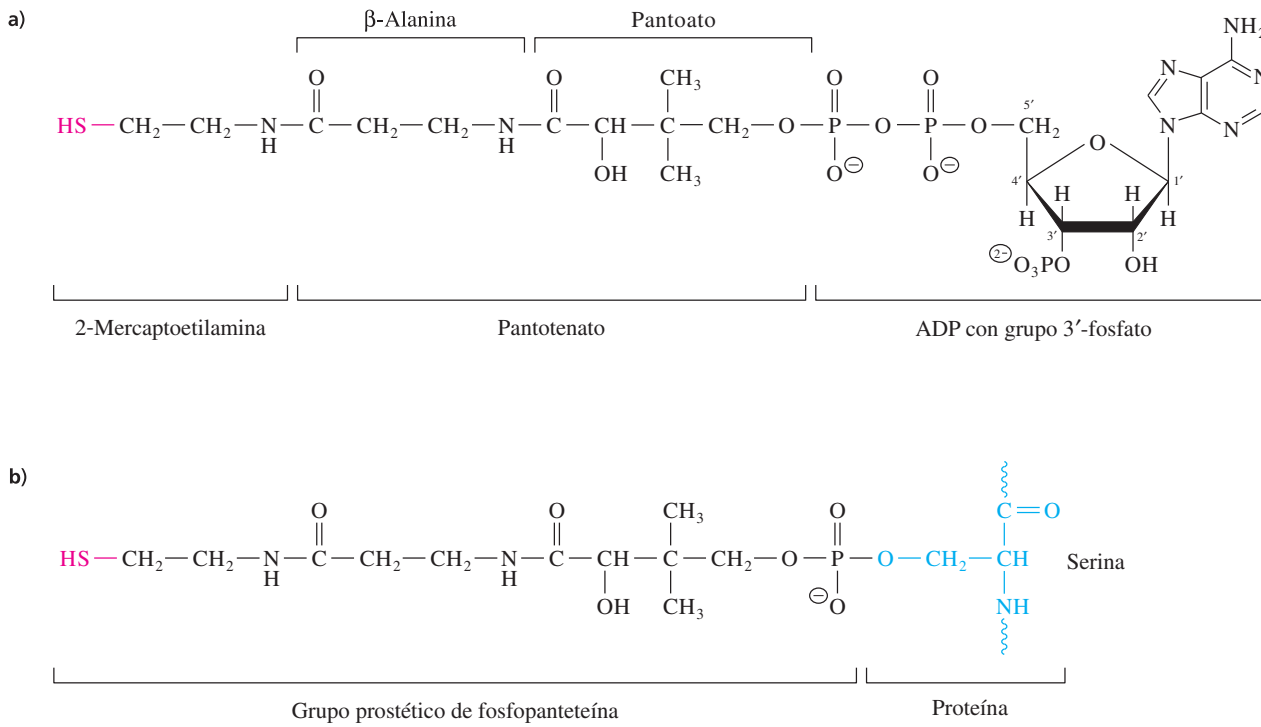


Figura 7.12 ▲
Coenzima A y proteína portadora de acilo (ACP). **a)** En la coenzima A, la 2-mercaptoetilamina está unida al pantotenato vitamina, que a su vez está enlazado, por una unión de fosfoéster, a un grupo ADP que tiene un grupo 3′-fosfato adicional. El centro reactivo es el grupo tiol (gris oscuro). **b)** En la proteína portadora de acilo, el grupo prostético de fosfopanteteína, formado por la 2-mercaptoetilamina y pantotenato de la coenzima A, se esterifica y forma un residuo de serina de la proteína.

grupo fosfato (figura 7.12a). El centro reactivo de la CoA es el grupo —SH. Los grupos acilo se unen en forma covalente al grupo —SH para formar tioésteres. Un ejemplo frecuente es la acetil CoA (figura 7.13), donde el grupo acilo es una mitad de acetilo. La acetil CoA es un compuesto rico en energía, por la alta energía del enlace de tioéster (sección 10.8). Al principio, el nombre de coenzima A se debió a su papel como la coenzima de acetilación. Con frecuencia se verá la acetil CoA al describir el metabolismo de los carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos.

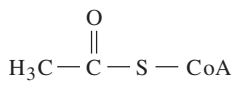
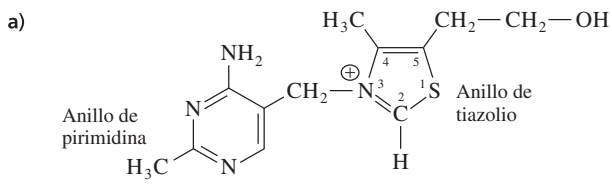


Figura 7.13 ▲
Acetil CoA.

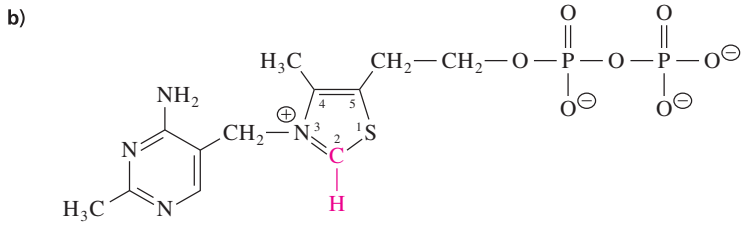
La fosfopanteteína, un éster de fosfato que contiene las mitades de 2-mercaptoetilamina y pantotenato de la coenzima A, es el grupo prostético de una pequeña proteína (de 77 residuos de aminoácidos) llamada proteína portadora de acilo (ACP, *acyl carrier protein*). El grupo prostético se esterifica formando ACP a través del oxígeno en la cadena lateral de un residuo de serina (figura 7.12b). El —SH del grupo prostético de la ACP es acilado por compuestos en la biosíntesis de los ácidos grasos (capítulo 16).

7.7 Pirofosfato de tiamina

La tiamina (o vitamina B_1) contiene un anillo de pirimidina y un anillo de tiazolio con carga positiva (figura 7.14a). En los mamíferos, la tiamina es una vitamina esencial. Abunda en las cáscaras de arroz y en otros cereales. Las deficiencias de vitamina B_1 causan beriberi. La diferencia se encuentra con más frecuencia en partes donde lo acostumbrado en la dieta es arroz sin cascarilla, porque la eliminación de la cascarilla también elimina la mayor parte de esta tiamina esencial. La coenzima es el pirofosfato de tiamina (TPP, *thiamine pyrophosphate*) (figura 7.14b). El TPP se sintetiza a partir de la tiamina, por transferencia enzimática de un grupo pirofosforilo del ATP.



Tiamina (vitamina B_1)



Pirofosfato de tiamina (TPP)

◀Figura 7.14
a) Tiamina (vitamina B_1). **b)** Pirofosfato de tiamina (TPP). El anillo de tiazolio en la coenzima contiene el centro reactivo (gris oscuro).

Se sabe que una media docena de descarboxilasas (carboxilasas) requieren TPP como coenzima. Por ejemplo, el TPP es el grupo prostético de la piruvato descarboxilasa de levadura, cuyo mecanismo se ve en la figura 7.15.

También el TPP es una coenzima que interviene en la descarboxilación oxidante de α-cetoácidos distintos del piruvato. Los primeros pasos de esas reacciones se efectúan con el mecanismo que muestra la figura 7.15. Además, el TPP es un grupo prostético para las enzimas llamadas transcetolasas, que catalizan la transferencia de grupos de dos carbonos que contienen un anillo ceto, entre moléculas de azúcar.

El anillo de tiazolio de la coenzima contiene al centro reactivo. El C-2 del TPP tiene una reactividad notable; es ácido a pesar de su pK_a extremadamente alto en soluciones acuosas. Experimentos recientes indican que el valor de pK_a de la ionización del pirofosfato de hidroxi-etiltiamina (HETPP, hydroxy-ethylthiamine pyrophosphate) (es decir, la formación del carbanión dipolar) cambia de 15 en agua a 6 en el sitio activo de la piruvato descarboxilasa. Esta mayor acidez se atribuye a la poca polaridad del sitio activo, y esto explica también la baja reactividad del TPP mismo.

El papel de la piruvato descarboxilasa en el metabolismo se presenta en la sección 11.3. Las transcetolasas se describen en la sección 12.9. La función de TPP como coenzima en la piruvato deshidrogenasa se describe en la sección 13.2

7.8 Fosfato de piridoxal

La familia de vitaminas B_6 hidrosolubles consiste en tres moléculas estrechamente relacionadas que sólo difieren en el estado de oxidación o aminación en el carbono unido a la posición 4 del anillo de piridina (figura 7.16a). La vitamina B_6, con mayor frecuencia piridoxal o piridoxamina, se encuentra con facilidad en muchas fuentes vegetales y animales. Las deficiencias de B_6 inducidas en ratas causan dermatitis y diversas alteraciones relacionadas con el metabolismo de las proteínas, pero en realidad son raras las deficiencias de B_6 en humanos. Una vez que la B6 entra a la célula, la transferencia enzimática del grupo γ-fosforilo del ATP forma la coenzima 5′-fosfato de piridoxal (PLP, *pyridoxal 5′-phosphate*) (figura 7.16b).

El fosfato de piridoxal es el grupo prostético de muchas enzimas que catalizan diversas reacciones donde intervienen aminoácidos, como isomerizaciones, descarboxilaciones y eliminaciones o sustituciones de cadena lateral. En enzimas dependientes de PLP, el grupo carbonilo del grupo prostético está unido como base de Schiff (imina) al grupo ε-amino de un residuo de lisina en el sitio activo. (Una base de Schiff se forma por condensación de una amina primaria con un aldehído o una cetona.) La enzima-coenzima base de Schiff, que se ve en la parte izquierda de la figura 7.17, a veces se conoce como aldimina interna. El PLP está fuertemente unido a la enzima mediante muchas interacciones

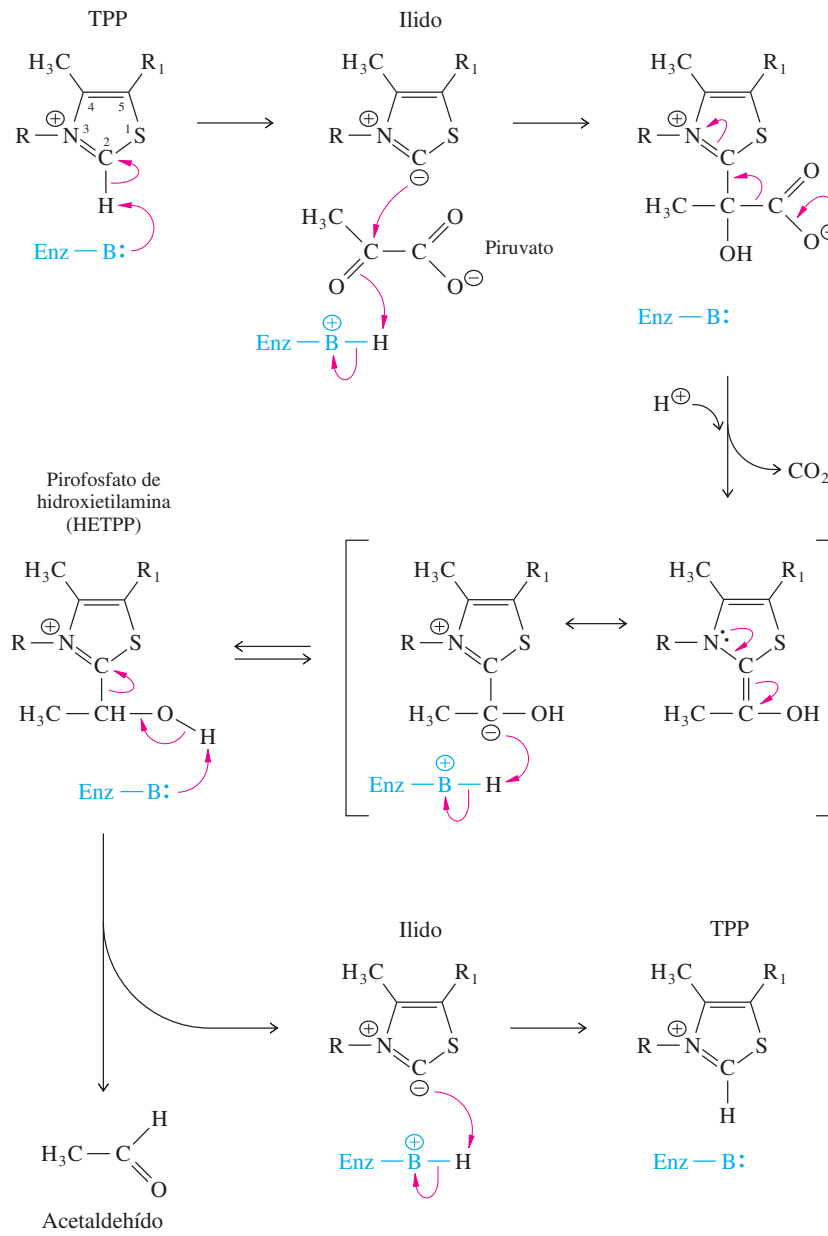
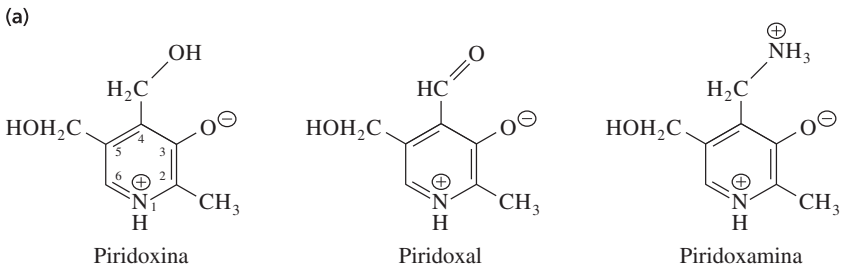


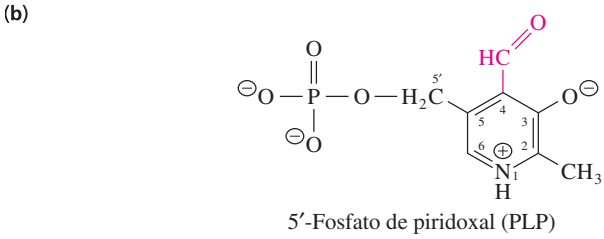
Figura 7.15 ▶
Mecanismo de la piruvato descarboxilasa de levadura. La carga positiva del anillo de tiazolio en el TPP atrae electrones y debilita el enlace entre el C-2 y el hidrógeno. Es probable que este protón sea eliminado por un residuo básico de la enzima. La ionización genera un carbanión dipolar estabilizado por resonancia, llamado ilido (molécula con cargas opuestas en átomos adyacentes). El C-2 con carga negativa ataca al carbono carbonílico deficiente en electrones, del sustrato piruvato, y se libera el primer producto (CO_2). Dos carbonos de piruvato están unidos ahora al anillo de tiazol como parte de un carbanión estabilizado por resonancia. En el paso siguiente, la protonación del carbanión produce pirofosfato de hidroxietilamina (HETPP). El HETPP se rompe y se libera acetaldehído (el segundo producto) y regenera la forma de ilido del complejo enzima-TPP. Se vuelve a formar TPP cuando el ilido es protonado por la enzima.

débiles no covalentes; el enlace covalente adicional de la aldimina interna ayuda a evitar la pérdida de la escasa coenzima, cuando la enzima no está funcionando.

En todas las reacciones enzimáticas dependientes de PLP con aminoácidos, el paso inicial es el enlazamiento del PLP al grupo α-amino del aminoácido; esto es, la formación de una aldimina externa. Cuando un aminoácido se une con una enzima-PLP, se efectúa una reacción de transaminación (figura 7.17). Esta reacción de transferencia se lleva a cabo pasando por una diamina geminal, y no por la forma del aldehído libre del PLP. Nótese que las bases de Schiff contienen un sistema de dobles enlaces conjugados en el anillo de piridina, que termina con una carga positiva en el N-1. En el $NAD^{\oplus}$. existen estructuras anulares parecidas, con átomos de nitrógeno con carga positiva. Durante los pasos siguientes en las reacciones catalizadas por las enzimas-PLP , el grupo prostético sirve como sumidero de electrones. Una vez que un α-aminoácido forma una base de Schiff con el PLP, al retirarse el electrón hacia el N-1 se debilitan los tres enlaces con el carbono α. En otras palabras, la base de Schiff con el PLP estabiliza un carbanión que se forma cuando se elimina uno de los tres grupos unidos al carbono α del aminoácido. El grupo que se pierda depende del ambiente químico en el sitio activo de la enzima.



◀ Figura 7.16
Vitaminas B_6 y fosfato de piridoxal. **a)** Vitaminas de la familia B_6: piridoxina, piridoxal y piridoxamina. **b)** 5′-Fosfato de piridoxal (PLP). El centro reactivo del PLP es el grupo aldehído (gris oscuro).



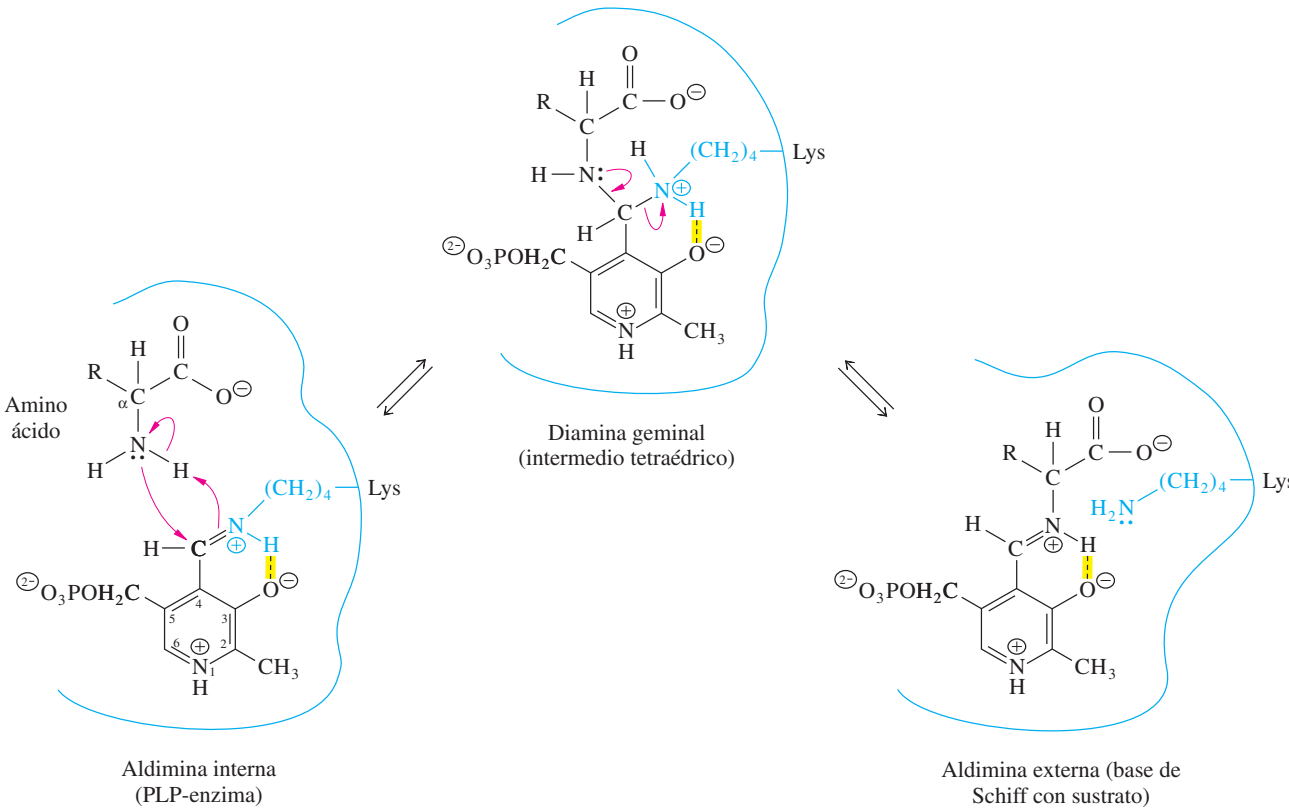


Figura 7.17 ▲
Unión de sustrato a una enzima dependiente de PLP. La base de Schiff que une al PLP con un residuo de lisina en la enzima es sustituida por reacción de la molécula de sustrato con PLP. La reacción de transaminación pasa por un compuesto intermedio de diamina geminal, y el resultado es una base de Schiff formada por PLP y el sustrato.

La eliminación del grupo α-amino de los aminoácidos es catalizada por las transaminasas, que participan tanto en la biosíntesis como en la degradación de los aminoácidos

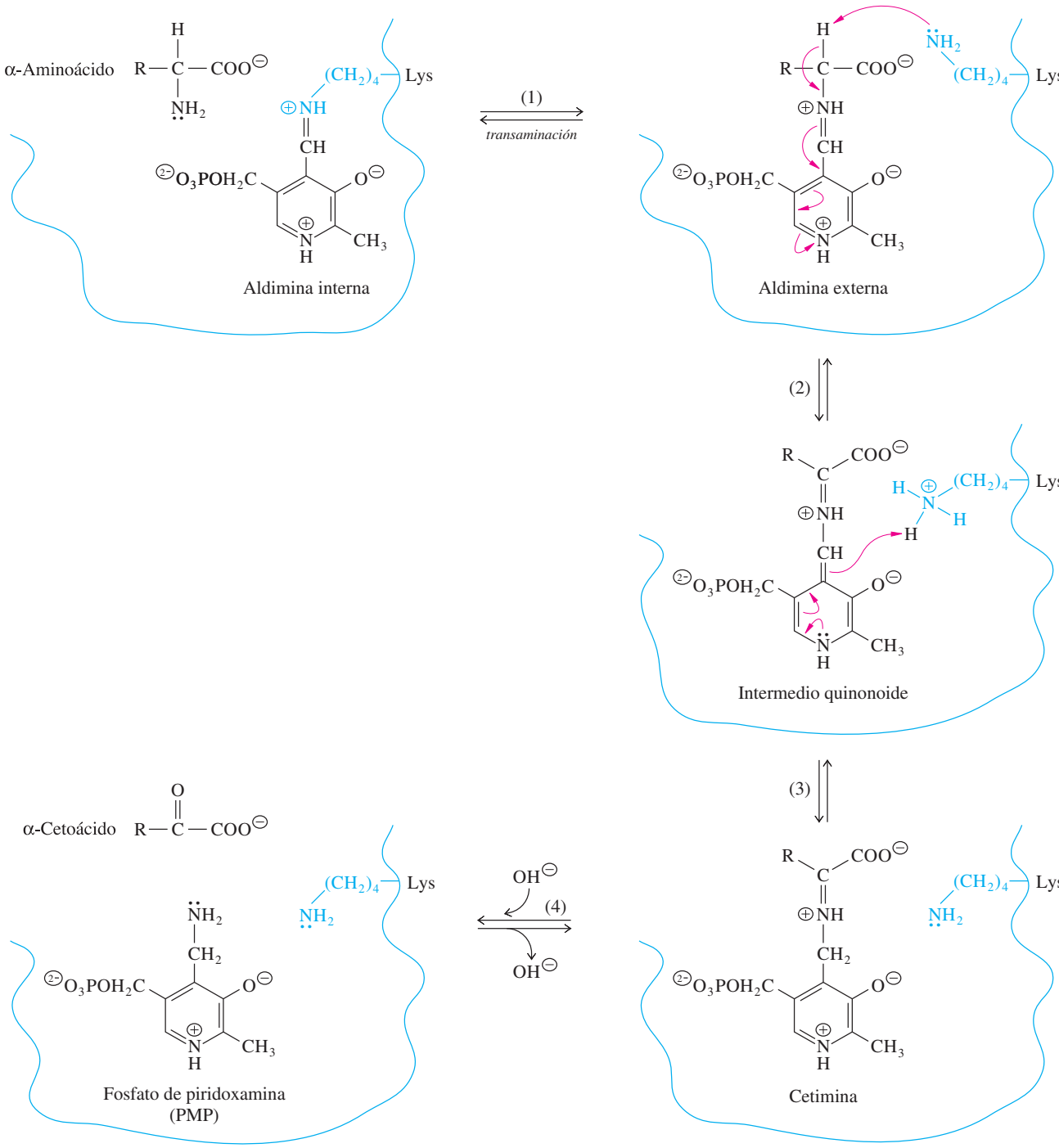


Figura 7.18 ▲
Mecanismo de las transaminasas. En el paso 1, un aminoácido desplaza la lisina de la aldimina interna que une al PLP con la enzima y genera una aldimina externa. En el paso 2, el hidrógeno α del aminoácido es sustraído mediante catálisis básica por el mismo residuo de lisina. Una reorganización electrónica conduce a un intermedio quinonoide. En el paso 3, la protonación del compuesto intermedio por el residuo de lisina produce una cetimina. En el paso 4, la hidrólisis de la cetimina forma un α-cetoácido, que se disocia, y PMP, que queda unido a la enzima. Si entra otro α-cetoácido, cada paso se efectúa en reversa. El grupo amino es transferido al α-cetoácido y produce un nuevo aminoácido y regenera la forma original de la enzima, PLP.

(sección 17.2B). Ya que la transaminación es la reacción dependiente de PLP que se encuentra con más frecuencia, se presenta un mecanismo de este tipo de reacciones en la figura 7.18. En la transaminación, se transfiere el grupo α-amino de un aminoácido al grupo carbonilo de un α-cetoácido, para producir un nuevo aminoácido, o para ser excretado. Las enzimas dependientes de PLP catalizan la transferencia del grupo amino formando el fosfato de piridoxamina (PMP, *pyridoxamine phosphate*) unido a la enzima, como un compuesto covalente. (En estas reacciones, el grupo $—NH_2$ del aminoácido es el reactivo, y no la forma $—NH_3^{\oplus}$, más abundante).

7.9 Biotina

La biotina es un grupo prostético para enzimas que catalizan reacciones de transferencia del grupo carboxilo y reacciones de carboxilación dependientes de ATP. La biotina está unida en forma covalente al sitio activo de su enzima anfitriona por un enlace de amida al grupo ε-amino de un residuo de lisina (figura 7.19).

La reacción de piruvato carboxilasa demuestra el papel de la biotina como portador del dióxido de carbono (figura 7.20). En esta reacción dependiente del ATP, el piruvato, el ácido de tres carbonos, reacciona con bicarbonato y forma el oxaloacetato, ácido de cuatro

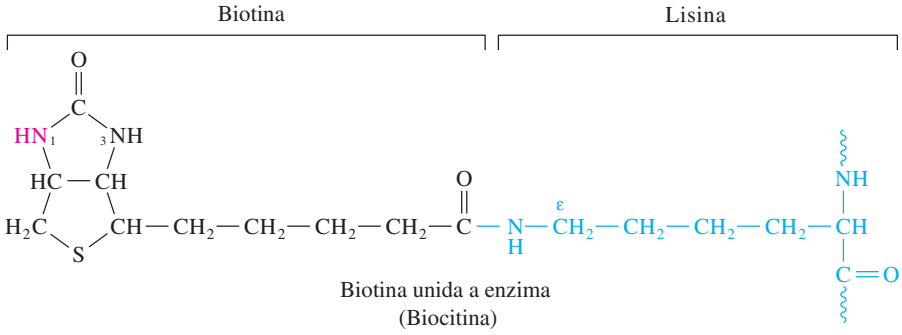


Figura 7.19 ▲
Biotina unida a enzima. El grupo carboxilato de la biotina está unido en forma covalente por enlace de amida al grupo ε-amino de un residuo de lisina (gris claro). El centro reactivo de la mitad de la biotina está en N-1 (gris oscuro).

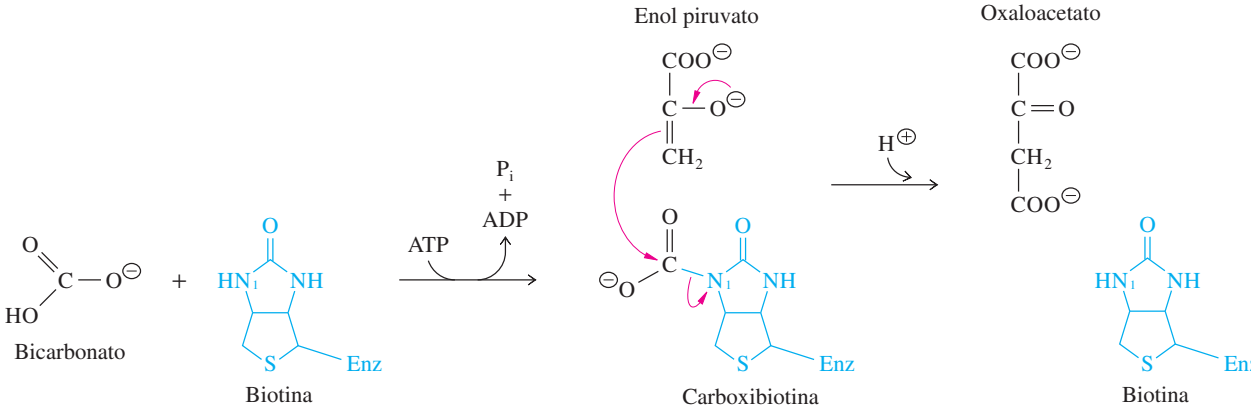


Figura 7.20 ▲
Reacción catalizada por la piruvato carboxilasa. Primero reacciona la biotina con el bicarbonato y el ATP para formar carboxibiotina. El complejo de carboxibiotinilo es una forma estable activada de CO_2, que puede transferirse al piruvato. A continuación, la forma enolato del piruvato ataca al grupo carboxilo de la carboxibiotina, forma oxaloacetato y regenera la biotina.

carbonos. Biotina, unida a enzimas, es el portador intermedio del grupo metabólico carboxilo, que es móvil. Todavía no se conoce el mecanismo con el que se carboxila la biotina.

La biotina se identificó por primera vez como factor esencial para el crecimiento de las levaduras. Como la biotina es sintetizada por las bacterias intestinales, y sólo se requiere en muy pequeñas cantidades (microgramos por día), es rara la deficiencia de biotina en los humanos o animales alimentados con dietas normales. Sin embargo, se puede inducir una deficiencia de biotina ingiriendo claras de huevo crudas, que contienen una proteína llamada avidina. La avidina se une fuertemente a la biotina y la hace no disponible para absorción en el tracto intestinal. Cuando se cocinan los huevos, la avidina se desnaturaliza y pierde su afinidad hacia la biotina.

Diversas técnicas de laboratorio aprovechan la gran afinidad de la avidina hacia la biotina. Por ejemplo, se puede extraer una sustancia con la que se une la biotina en forma covalente, a partir de una mezcla compleja, mediante cromatografía de afinidad (sección 3.6) en una columna de avidina inmovilizada.

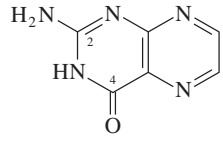
7.10 Tetrahidrofolato

La vitamina folato se aisló por primera vez a principios de la década de 1940, a partir de hojas verdes, hígado y levadura. El folato tiene tres componentes principales: pterina (2-amino-4-oxopteridina), una mitad de ácido *p*-aminobenzoico, y un residuo de glutamato. En las figuras 7.21a y 7.21b se muestran las estructuras de la pterina y el folato. Los humanos requieren folato en su dieta, porque no pueden sintetizar el compuesto pterina-ácido *p*-aminobenzoico (PABA, *p-aminobenzoic acid*), y no se puede adicionar glutamato a PABA exógeno.

La estructura de la coenzima folato, que se llaman tetrahidrofolato en forma colectiva, difieren de la vitamina en dos cosas: son compuestos reducidos (5,6,7,8-tetrahidropterinas) y están modificadas por adición de residuos de glutamato unidos entre sí mediante enlaces de γ-glutamilamida (figura 7.21c). La mitad aniónica de poliglutamilo, en general con cinco a seis residuos de longitud, participa en el enlazamiento de las coenzimas a las enzimas. Cuando se usa el término *tetrahidrofolato* se debe considerar que se refiere a compuestos que tienen colas de poliglutamato de diversas longitudes.

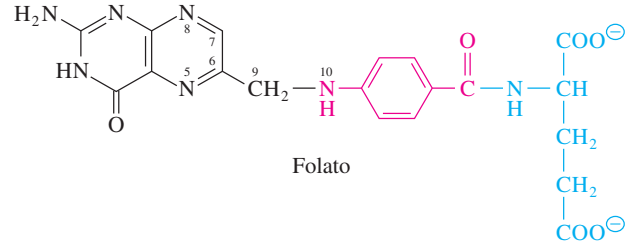
El tetrahidrofolato se forma adicionando hidrógeno a las posiciones 5, 6, 7 y 8 del sistema anular de pterina. El folato se reduce en dos pasos dependientes de NADPH, en una reacción catalizada por dihidrofolato reductasa.

a)



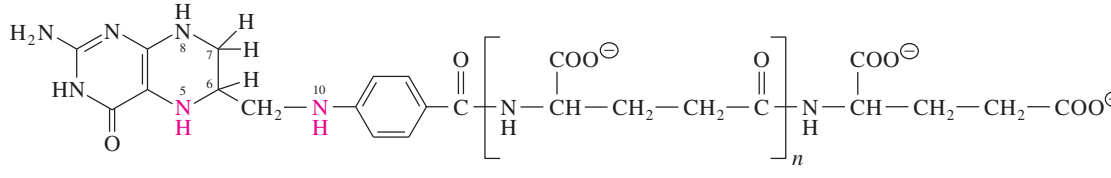
Pterina
(2-Amino-4-oxopteridina)

b)



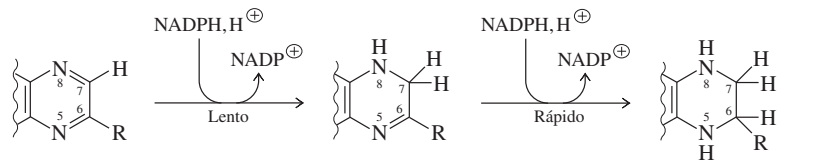
Folato

c)



Tetrahidrofolato (Poliglutamato de tetrahidrofolilo)

Figura 7.21▲
Pterina, folato y tetrahidrofolato. La pterina **a)** es parte del folato **b)**, molécula que contiene *p*-aminobenzoato (gris oscuro) y glutamato (gris claro) **c)** Las formas poliglutamato del tetrahidrofolato suelen contener cinco o seis residuos de glutamato. Los centros reactivo de la coenzima, N-5 y N-10, se muestran en gris oscuro.

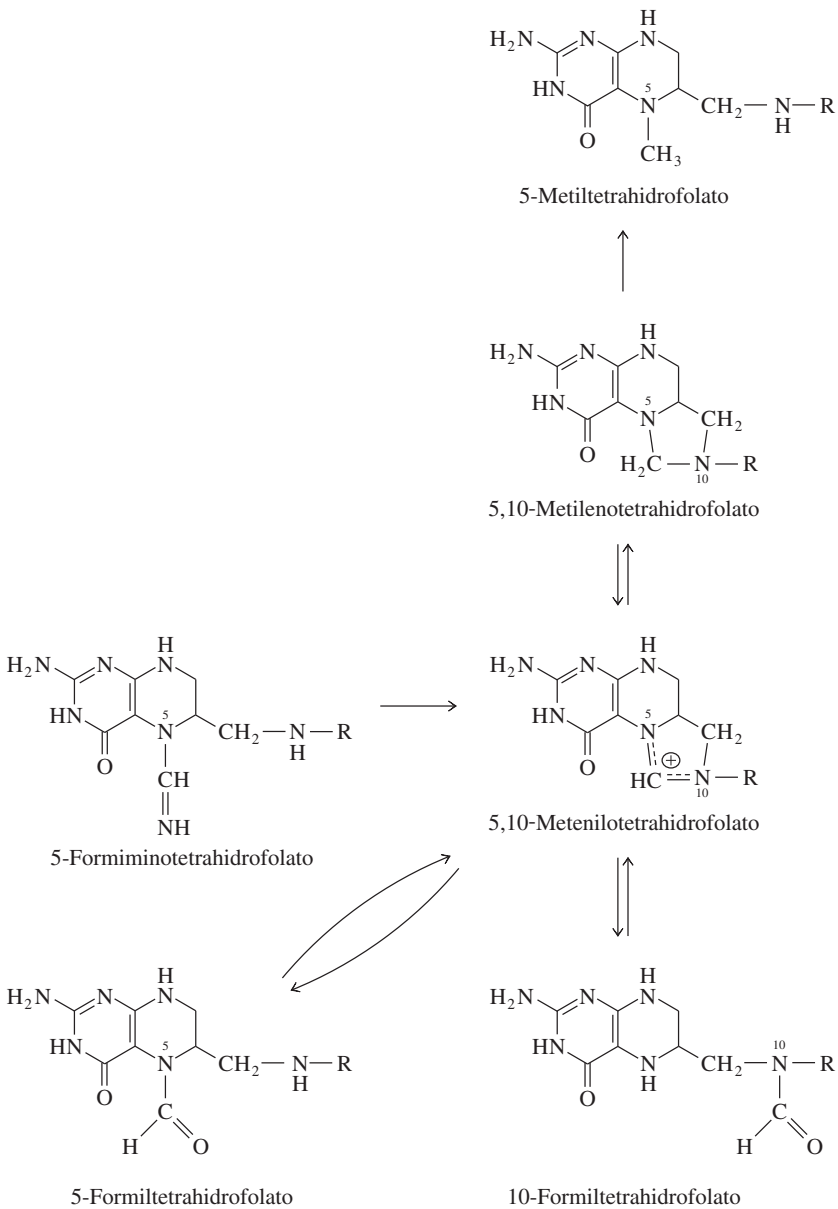


Folato 7,8-Dihidrofolato 5,6,7,8-Tetrahidrofolato

(7.4)

La principal función metabólica de la dihidrofolato reductasa es la reducción del hidrofolato producido durante la formación del grupo metilo en el timidilato (dTMP)(capítulo 18). Esta reacción, que usa un derivado del tetrahidrofolato, es un paso esencial en la biosíntesis del ADN. Como no puede efectuarse la división celular cuando se interrumpe la síntesis del ADN, se ha estudiado la dihidrofolato reductasa como blanco de quimioterapia en el tratamiento del cáncer.

Las enzimas que catalizan transferencias bioquímicas de varias unidades de un carbono requieren 5,6,7,8-tetrahidrofolato. Los grupos unidos al tetrahidrofolato son



◀ Figura 7.22
Derivados de tetrahidrofolato con un carbono. Los derivados pueden convertirse entre sí enzimáticamente por las rutas indicadas. (R representa la parte de poliglutamato de benzoílo en el tetrahidrofolato).

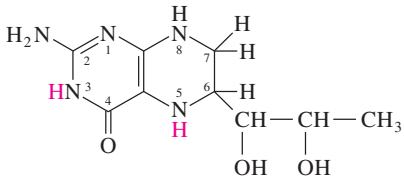


Figura 7.23 ▲
5,6,7,8-Tetrahidrobiopterina. Los átomos de hidrógeno que se pierden en la oxidación están en gris oscuro.

metilo, metileno o formilo. La figura 7.22 muestra las estructuras de varios derivados de un carbono, del tetrahidrofolato, y las interconversiones enzimáticas que hay entre ellos. Los grupos metabólicos de un carbono están unidos en forma covalente al N-5 de amina secundaria o al N-10 del tetrahidrofolato, o a ambos, en una forma de anillo. El 10-formiltetrahidrofolato es el donador de grupos formilo, y el 5,10-metilenotetrahidrofolato es el donador de los grupos hidroximetilo.

Otra coenzima de pterina, la 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina, tiene una cadena lateral de tres carbonos en el C-6 de la mitad de pterina, en vez de la gran cadena lateral que hay en el tetrahidrofolato (figura 7.23). Esta coenzima no se deriva de alguna vitamina, sino que los animales y otros organismos la sintetizan. La tetrahidrobiopterina es el cofactor de diversas hidolasas, y es un agente reductor en la conversión de fenilalanina a tirosina (capítulo 17). También la necesita la enzima que cataliza la síntesis del óxido nítrico a partir de la arginina (sección 17.12).

7.11 Cobalamina

La cobalamina (vitamina B_2) es la mayor de las vitaminas B, y fue la última que se aisló. La estructura de la cobalamina (figura 7.24a) tiene un sistema corrin anular que se asemeja al sistema anular de porfirina en el hemo (figura 4.39). Nótese que la cobalamina contiene cobalto en lugar del hierro que hay en el hemo. La estructura abreviada que se ve en la figura 7.24b da énfasis a las posiciones de dos ligandos axiales unidos al cobalto, un benzimidazol ribonucleótido, abajo del anillo corrin, y un grupo R arriba de éste. En la estructura de la coenzima cobalamina, el grupo R es un grupo metilo (en la metil-cobalamina) o un grupo de 5′-desoxiadenosilo (en la adenosilcobalamina).

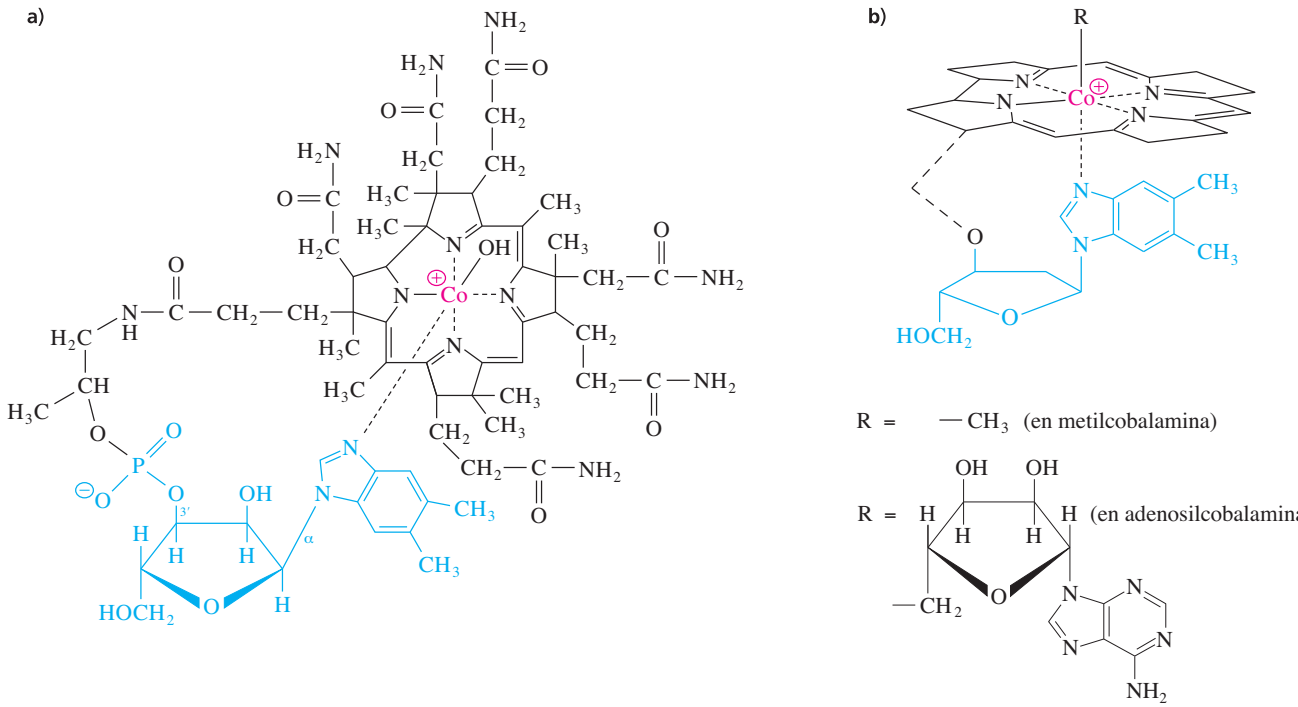
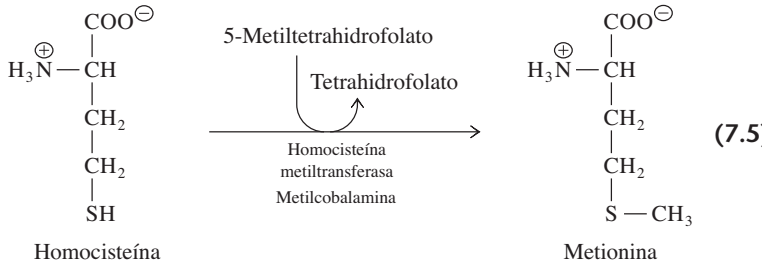


Figura 7.24 ▲
Cobalamina (vitamina B_{12}) y sus coenzimas. **a)** Estructura detallada de la cobalamina, que muestra el sistema de anillo corrin (negro) y el 5,6-dimetilbenzimidazol ribonucleótido (gris claro). El metal coordinado por corrin es cobalto (gris oscuro). El ribonucleótido de benzimidazol está coordinado con el cobalto del anillo corrin, y también está unido a una cadena lateral del sistema de anillo corrin por un enlace de fosfoéster. **b)** Estructura abreviada de las coenzimas de cobalamina. Un benzimidazol ribonucleótido está abajo del anillo corrin, y un grupo R está arriba del anillo.

Algunas especies de bacterias sintetizan la cobalamina. Todos los animales la requieren como micronutriente, y también algunas bacterias y algas. Las plantas no requieren cobalamina, por lo que no la sintetizan. En consecuencia, y en el caso normal, los humanos obtienen la vitamina B_{12} a partir de alimentos de origen animal. Con frecuencia, los vegetarianos logran cantidades adecuadas producidas por microorganismos. La deficiencia de cobalamina puede causar anemia perniciosa, enfermedad potencialmente fatal debida a una disminución en la producción de glóbulos rojos por la médula ósea. La anemia perniciosa también puede causar afecciones neurológicas. La mayoría de las víctimas de anemia perniciosa no secretan una glucoproteína necesaria (llamada factor intrínseco) en la mucosa estomacal. Esta proteína se une en forma específica a la cobalamina, y el complejo de cobalamina-factor intrínseco es absorbido por las células del intestino delgado. La mala absorción de la cobalamina se combate hoy con inyecciones periódicas de la vitamina.

El papel de la adenosilcobalamina refleja la reactividad de su enlace C—Co. La coenzima participa en varias reorganizaciones intramoleculares catalizadas por enzimas, en las que intercambian lugares un átomo de hidrógeno y un segundo grupo, unidos a átomos de carbono adyacentes (figura 7.25a). Un ejemplo es la reacción de metilmalonil CoA mutasa (figura 7.25b), importante en el metabolismo de ácidos grasos de cadena impar (capítulo 16), y da como resultado la formación de succinil CoA, compuesto en el ciclo del ácido cítrico.

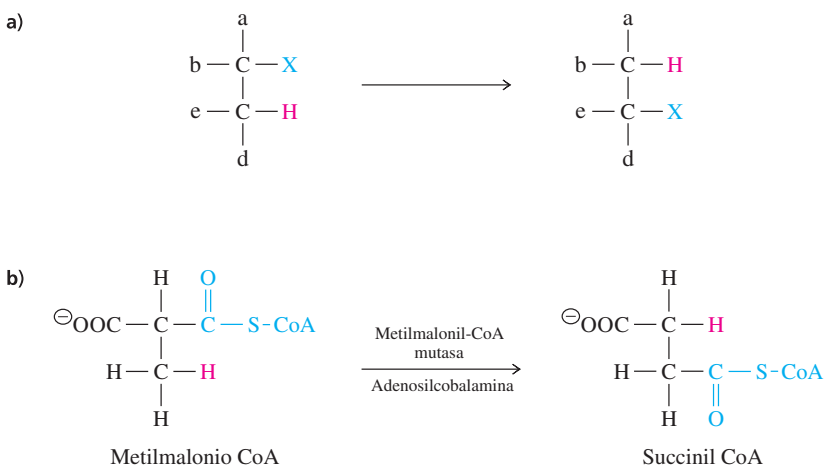
La metilcobalamina participa en la transferencia de grupos metilo, como en la regeneración de metionina a partir de homocisteína en los mamíferos.



Homocisteína Metionina **(7.5)**

En esta reacción, el grupo metilo del 5-metiltetrahidrofolato se pasa a una forma reactiva y reducida de la cobalamina para formar metilcobalamina, que puede transferir el grupo metilo a la cadena lateral del tiol, en la homocisteína.

La tercera clase de enzimas de cobalamina consiste en las deshalogenasas reductoras dependientes de la vitamina B_{12}. Son enzimas bacterianas que destoxifican a moléculas orgánicas cloradas, incluyendo los policlorobifenilos (PCB).



◀ Figura 7.25
Reorganizaciones intramoleculares catalizados por enzimas dependientes de adenosilcobalamina. **a)** Reorganización en la que intercambian lugares un átomo de hidrógeno y un sustituyente en un átomo de carbono adyacente. **b)** Reorganización de metilmalonil CoA para formar succinil CoA, catalizado por metilmalonil-CoA mutasa.

7.12 Lipoamida

La coenzima lipoamida es la forma de ácido lipoico unida a proteína. Aunque a menudo se dice que el ácido lipoico es una vitamina B, parece que los animales pueden sintetizarlo. Lo requieren ciertas bacterias y protozoarios para crecer. El ácido lipoico es un ácido carboxílico con ocho carbonos (ácido octanoico) en el que se han sustituido dos átomos de hidrógeno, uno en el C-6 y otro en el C-8, por grupos sulfhidrilo en enlaces disulfuro. El ácido lipoico siempre está unido en forma covalente por un enlace de amida, a través de su grupo carboxilo, al grupo ε-amino de un residuo de lisina en una proteína (figura 7.26). Esta estructura se encuentra en las dihidrolipoamida aciltransferasas, componentes proteínicos del complejo piruvato deshidrogenasa, y en el complejo α-cetoglutarato deshidrogenasa; ambos complejos son de varias enzimas, y están asociados al ciclo del ácido cítrico.

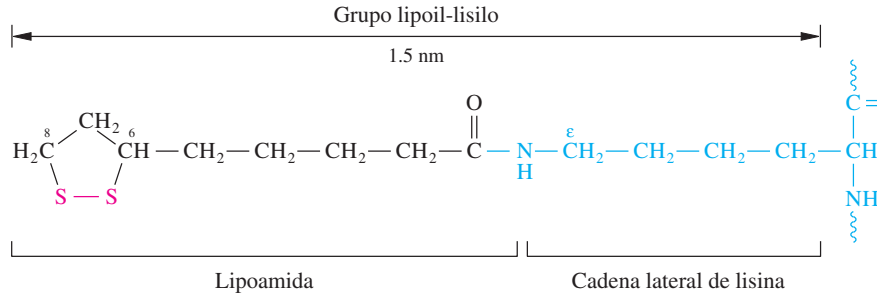
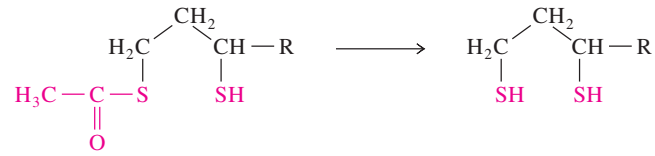


Figura 7.26 ▶
Lipoamida. El ácido lipoico está unido por enlace de amina al grupo ε-amino de un residuo de lisina (gris claro) en las dihidrolipoamida aciltransferasas. El anillo de ditiolano en los grupos lipoil-lisilo se extiende 1.5 nm desde la columna vertebral del polipéptido. El centro reactivo de la coenzima se muestra en gris oscuro.

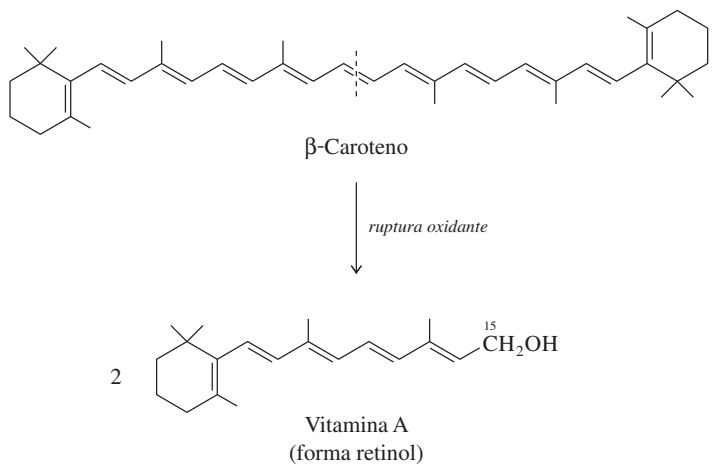
Se cree que la lipoamida funciona como brazo giratorio que lleva y trae grupos acilo entre sitios activos, en complejos de varias enzimas. Por ejemplo, en el complejo de piruvato deshidrogenasa (sección 13.1), el anillo de disulfuro en el grupo prostético de lipoamida reacciona con HETPP (figura 7.15), uniendo su grupo acetilo al átomo de azufre unido al C-8 de la lipoamida, para formar un tioéster. A continuación, el grupo acilo se transfiere al átomo de azufre de una molécula de coenzima A para generar la forma reducida (dihidrolipoamida) del grupo prostético.



El paso final catalizado por el complejo de piruvato deshidrogenasa es la oxidación de la dihidrolipoamida. En esta reacción se forma NADH por acción de una flavoproteína componente del complejo. Las acciones de las diversas coenzimas del complejo piruvato deshidrogenasa muestran cómo las coenzimas, al proporcionar grupos reactivos que aumentan la versatilidad catalítica de las proteínas, se usan para conservar tanto la energía como elementos constructivos carbonados.

7.13 Vitaminas lipídicas

Las estructuras de las cuatro vitaminas lipídicas (A, D, E y K) contienen anillos y largas cadenas laterales alifáticas. Las vitaminas lipídicas son muy hidrofóbicas, aunque cada una posee cuando menos un grupo polar. Al ingerirse son absorbidas en el intestino por un proceso parecido a la absorción de otros nutrientes lípidos (sección 16.1a). Después de digerir toda la proteína que pueda estar unida a ellas, son arrastradas a la interfase celular del intestino en forma de micelas formadas con sales biliares. El estudio de esas moléculas hidrofóbicas ha presentado varias dificultades técnicas, por lo que la investigación de



◀ Figura 7.27
Formación de vitamina A a partir de β-caroteno.

su mecanismo ha sido más lenta que la de sus contrapartes hidrosolubles. Las vitaminas lipídicas difieren mucho en sus funciones, como se verá a continuación.

A. Vitamina A

La vitamina A, o retinol, es una molécula lipídica con 20 carbonos, que se obtiene en la dieta, ya sea en forma directa o indirecta, como β-caroteno. Las zanahorias y otras verduras amarillas son ricas en β-caroteno, un lípido vegetal con 40 carbonos cuya ruptura oxidante enzimática produce la vitamina A (figura 7.27). La vitamina A existe en tres formas que difieren en estado de oxidación del grupo funcional terminal: el retinol, un alcohol estable, el retinal, un aldehído, y el ácido retinoico. Los tres compuestos tienen funciones biológicas importantes. El ácido retinoico es un compuesto señalador que se une a proteínas receptoras dentro de las células; los complejos ligando-receptor se unen entonces a cromosomas y pueden regular la expresión genética durante la diferenciación celular. El aldehído retinal es un compuesto sensible a la luz, con importante papel en la visión. El retinal es el grupo prostético de la proteína rodopsina, y la absorción de un fotón de luz en el retinal dispara un impulso nervioso.

B. Vitamina D

La vitamina D es un nombre colectivo de un grupo de lípidos relacionados. Cuando los humanos se exponen a suficiente luz solar, se forma vitamina D_3 (colecalciferol) en forma no enzimática, en la piel, a partir del esteroide 7-dehidrocolesterol. La vitamina D_2, compuesto relacionado con la vitamina D_3 (la D_2 tiene un grupo metilo adicional) es el aditivo en leches fortificadas. La forma activa de la vitamina D_3, el 1,25-dihidroxicolecalciferol, se forma a partir de la vitamina D_3 mediante dos reacciones de hidroxilación (figura 7.28); la vitamina D_2 se activa en forma parecida. Los compuestos activos son hormonas que ayudan a controlar la utilización de Ca^{2+} en los humanos; la vitamina D regula tanto la absorción intestinal del calcio, como su depósito en los huesos. En enfermedades por deficiencia de vitamina D, como raquitismo en niños y osteomalacia en adultos, los huesos son débiles, porque el fosfato de calcio no cristaliza bien sobre la matriz de colágeno en los huesos.

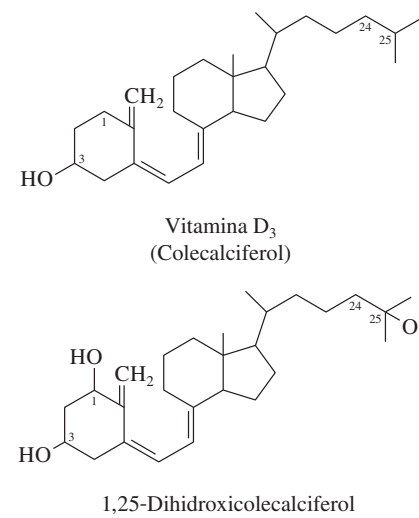
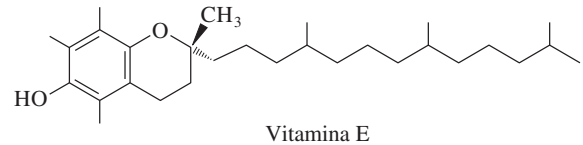


Figura 7.28 ▲
Vitamina D_3 (colecalciferol) y 1,25-dihidroxicolecalciferol. (La vitamina D_2 tiene un grupo metilo adicional en el C-24). El 1,25-dihidroxicolecalciferol se produce a partir de la vitamina D_3 mediante dos hidroxilaciones separadas.

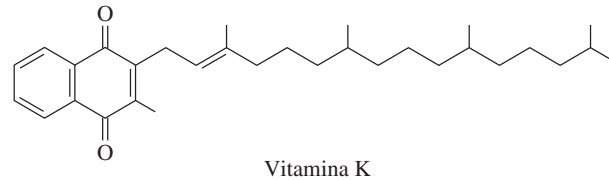
C. Vitamina E

La vitamina E, o α-tocoferol (figura 7.29) es uno de varios tocoferoles estrechamente relacionados; son compuestos que tienen un sistema anular bicíclico oxigenado, con una cadena lateral hidrofóbica. El grupo fenol de la vitamina E puede oxidarse y formar un radical libre estable. Se cree que la vitamina E funciona como agente reductor que secuestra oxígeno y radicales libres; esta acción oxidante podría evitar daños a los ácidos grasos en las membranas biológicas. Son raras las deficiencias de vitamina E, pero pueden causar glóbulos rojos frágiles y daño neurológico.

Figura 7.29 ▶
Estructuras de la vitamina E y la vitamina K.



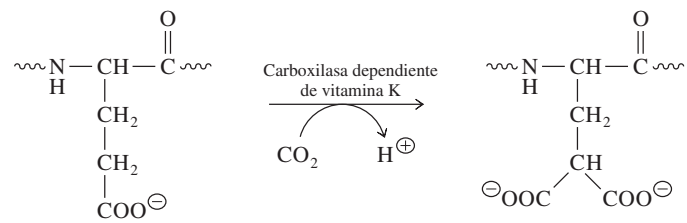
Vitamina E
(α-tocoferol)



Vitamina K
(filoquinona)

D. Vitamina K

La vitamina K (filoquinona) (figura 7.29) es una vitamina lipídica procedente de plantas, necesaria en la síntesis de algunas de las proteínas que intervienen en la coagulación sanguínea. Es una coenzima de una carboxilasa de mamíferos que cataliza la conversión de residuos específicos de glutamato para formar residuos de γ-carboxiglutamato (ecuación 7.7). La forma reducida (hidroquinona) de la vitamina K participa en la carboxilación como agente reductor. Cuando se enlaza calcio a los residuos de γ-carboxiglutamato de las proteínas de coagulación, esas proteínas se adhieren a superficies de plaquetas, donde se llevan a cabo muchos pasos del proceso de coagulación. A veces se administran análogos de la vitamina K a individuos que padecen de coagulación excesiva. Los análogos son inhibidores competitivos de las enzimas que catalizan la regeneración de la dihidrovitamina K a partir de las especies oxidadas que se formaron durante la carboxilación del glutamato; los análogos hacen bajar la carboxilación (y en consecuencia la coagulación) porque limitan la cantidad de dihidrovitamina K.



Residuo glutamato — Residuo γ-carboxiglutamato

(7.7)

7.14 Ubiquinona

En la figura 14.21 se muestra la estructura de la menaquinona.

La ubiquinona, llamada también coenzima Q y en consecuencia se abrevia Q, es una coenzima soluble en lípidos, sintetizada por casi todas las especies. Es una benzoquinona con cuatro sustituyentes, uno de los cuales es una larga cadena hidrofóbica (figura 7.30a). Esta cadena, formada por 6 a 10 unidades de isoprenoides, permite que la ubiquinona se disuelva en los lípidos de las membranas. En la membrana, la ubiquinona transporta electrones entre complejos enzimáticos embebidos en la membrana. Algunas bacterias usan menaquinona en vez de ubiquinona. Un análogo de la ubiquinona, llamado plastoquinona (figura 7.30b) desempeña una función similar en el transporte fotosintético de cloroplastos (capítulo 15).

La ubiquinona es un agente oxidante más enérgico que $NAD^{\oplus}$ o que las coenzimas de flavina. En consecuencia, lo pueden reducir NADH o $FADH_2$. Igual que el FMN y el FAD, la ubiquinona puede aceptar o donar dos electrones, uno o dos al mismo tiempo, porque tiene tres estados de oxidación: Q oxidado, radical libre de semiquinona parcialmente

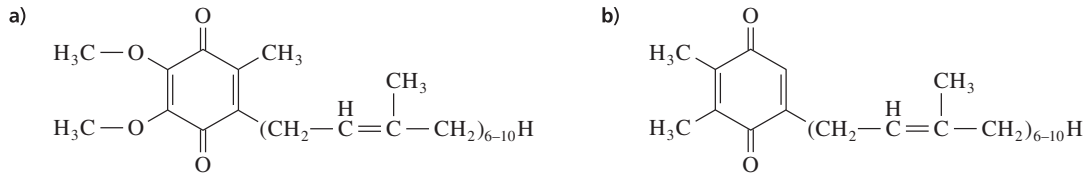
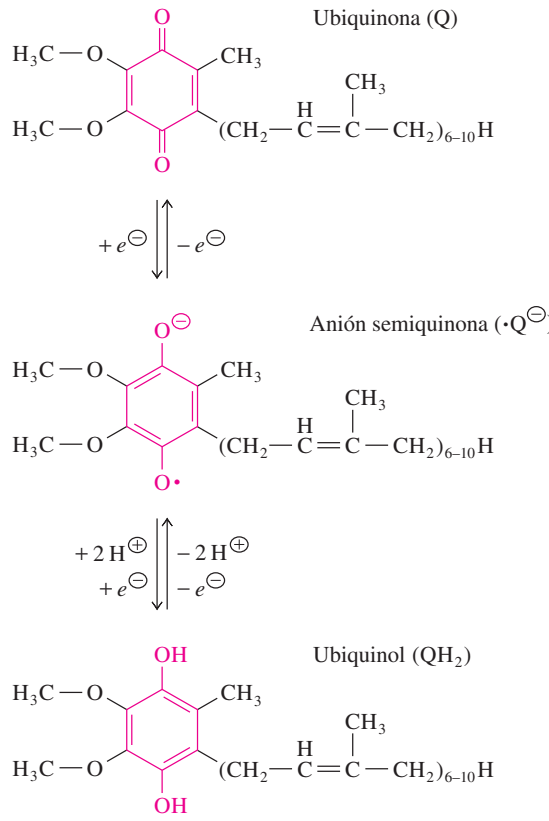


Figura 7.30 ▲
Estructuras de **a)** ubiquinona y **b)** plastoquinona. La cola hidrofóbica de cada molécula está formada por 6 a 10 unidades de isoprenoides de 5 carbonos.



◀ Figura 7.31
Tres estados de oxidación de la ubiquinona. La ubiquinona se reduce en dos pasos, de un electrón cada uno, a través de un radical libre de semiquinona. El centro reactivo de la ubiquinona se muestra en gris oscuro.

La fuerza de los agentes oxidantes de coenzima (potencial estándar de reducción) se describe en la sección 10.9.

reducida y la totalmente reducida QH_2, llamada ubiquinol (figura 7.31). La coenzima Q tiene un papel principal en el transporte de electrones asociado a la membrana. Es responsable de mover protones de uno a otro lado de la membrana, por un proceso llamado ciclo Q (capítulo 14). El gradiente de protones que resulta impulsa la síntesis de ATP.

7.15 Proteínas coenzimas

Algunas proteínas funcionan como coenzimas. No catalizan reacciones ellas mismas, pero ciertas enzimas las necesitan. Esas coenzimas se llaman proteínas de transferencia de grupo, o **proteínas coenzimas.** Contienen un grupo funcional que es parte de la columna vertebral de la proteína, o bien es un grupo prostético. En general son más pequeñas y más termoestables que la mayor parte de las enzimas. Las proteínas coenzimas se llaman *coenzimas* porque participan en muchas y diversas reacciones, y se asocian a una variedad de enzimas diferentes.

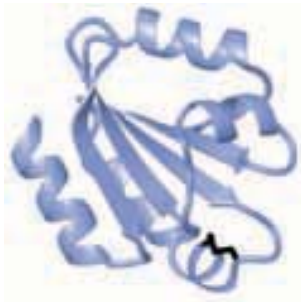


Figura 7.32 ▲
Tiorredoxina oxidada. Obsérvese que el grupo de cistina está en la superficie expuesta de la proteína. Los átomos de azufre se indican en negro. [PDB 1ERU].

En la figura 4.24m se muestra otra vista de la tiorredoxina.

Algunas proteínas coenzimas participan en reacciones de transferencia de grupo, o en reacciones de oxidación-reducción donde el grupo transferido es hidrógeno o un electrón. Los iones metálicos, grupos de hierro-azufre y grupos hemo son centros reactivos que se suelen encontrar en estas proteínas coenzimas. (Los citocromos son una clase importante de proteínas coenzimas que contienen grupos hemo como prostéticos. Vea la sección 7.16). Varias proteínas coenzimas tienen dos cadenas laterales de tiol en centro reactivo, que cambian entre sus formas ditiol y disulfuro. Por ejemplo, las tiorredoxinas tienen cisteínas a tres residuos de distancia (—Cys—X—X—Cys—). Las cadenas laterales de tiol en estos residuos de cisteína sufren una oxidación reversible para formar el enlace de disulfuro de una unidad de cistina. Suelen encontrarse tiorredoxinas como agentes reductores cuando se examine el ciclo del ácido cítrico (capítulo 13), la fotosíntesis (capítulo 5) y la síntesis de desoxirribonucleótidos (capítulo 18). El centro reactivo disulfuro en la tiorredoxina está en la superficie de la proteína, así que es accesible a los sitios activos de las enzimas adecuadas (figura 7.32).

Algunas otras proteínas coenzimas contienen a su vez coenzimas firmemente enlazadas, o porciones de coenzimas. En *Escherichia coli,* una proteína portadora de carboxilo que contiene biotina enlazada en forma covalente es una de los tres componentes proteínicos de acetil CoA carboxilasa, que cataliza el primer paso de la síntesis de ácidos grasos. (En las acetil CoA carboxilasas de animales, los tres componentes de proteínas están unidas en una cadena de proteína). El ACP, que se presenta en la sección 7.6, contiene una mitad de fosfopanteteína como su centro reactivo. Entonces, las reacciones de ACP se parecen a las de la coenzima A. ACP es un componente de todas las ácido graso sintetasas que se han analizado. Una proteína coenzima necesaria para la degradación de la glicina en mamíferos, plantas y bacterias (capítulo 17) contiene una molécula de lipoamida enlazada en forma covalente como grupo prostético.

7.16 Citocromos

Los citocromos son proteínas coenzimas que contienen hemo, cuyos átomos de Fe(III) sufren reducción reversible de un electrón. En las figuras 4.21 y 4.24b se mostraron algunas estructuras de citocromos. Los citocromos pueden ser de clase a, b y c, de acuerdo con sus espectros de absorción visible. Las clases tienen grupos hemo prostéticos un poco diferentes (figura 7.33). El grupo hemo de los citocromos tipo b es igual al de hemoglobina y mioglobina (figura 4.44). El hemo del citocromo a tiene una cadena hidrofóbica de 17 carbonos en el C-2 del anillo de porfirina, y un grupo formilo en el C-8, en tanto que el hemo tipo b tiene un grupo vinilo unido al C-2 y un grupo metilo en el C-8. En los citocromos tipo c, el hemo está unido en forma covalente a la apoproteína por grupos vinilo del hemo mediante dos enlaces tioéter que se forman por adición de los grupos tiol de dos residuos de cisteína.

Como se indicó antes, se pueden diferenciar los citocromos por sus espectros de absorción. En la figura 7.34 se muestran los espectros de absorción del citocromo c reducido y oxidado. Aunque la banda más absorbente es la banda Soret (o banda γ), la banda indicada con α se usa para caracterizar a los citocromos en sus tipos *a*, *b* o *c*. Los citocromos de la misma clase pueden tener espectros un poco diferentes, y en consecuencia se usa a menudo un subíndice numérico para indicar la longitud de onda del máximo en la banda de absorción α del citocromo reducido, entre los citocromos de determinada clase (por ejemplo, citocromo b_{560}). En la tabla 7.3 se ven las longitudes de onda de la absorción máxima para los citocromos reducidos.

La tendencia a transferir un electrón a otra sustancia, medida como potencial de reducción, varía también entre los citocromos individuales. Las diferencias se deben al distinto ambiente que proporciona cada apoproteína a su grupo hemo como prostético. Los potenciales de reducción de los conjuntos de hierro-azufre varían mucho, dependiendo también del ambiente químico y físico que proporcione la apoproteína. El intervalo de potenciales de reducción entre grupos prostéticos es una propiedad importante de las rutas de transporte electrónico asociado a membranas (capítulo 14) y de la fotosíntesis (capítulo 15).

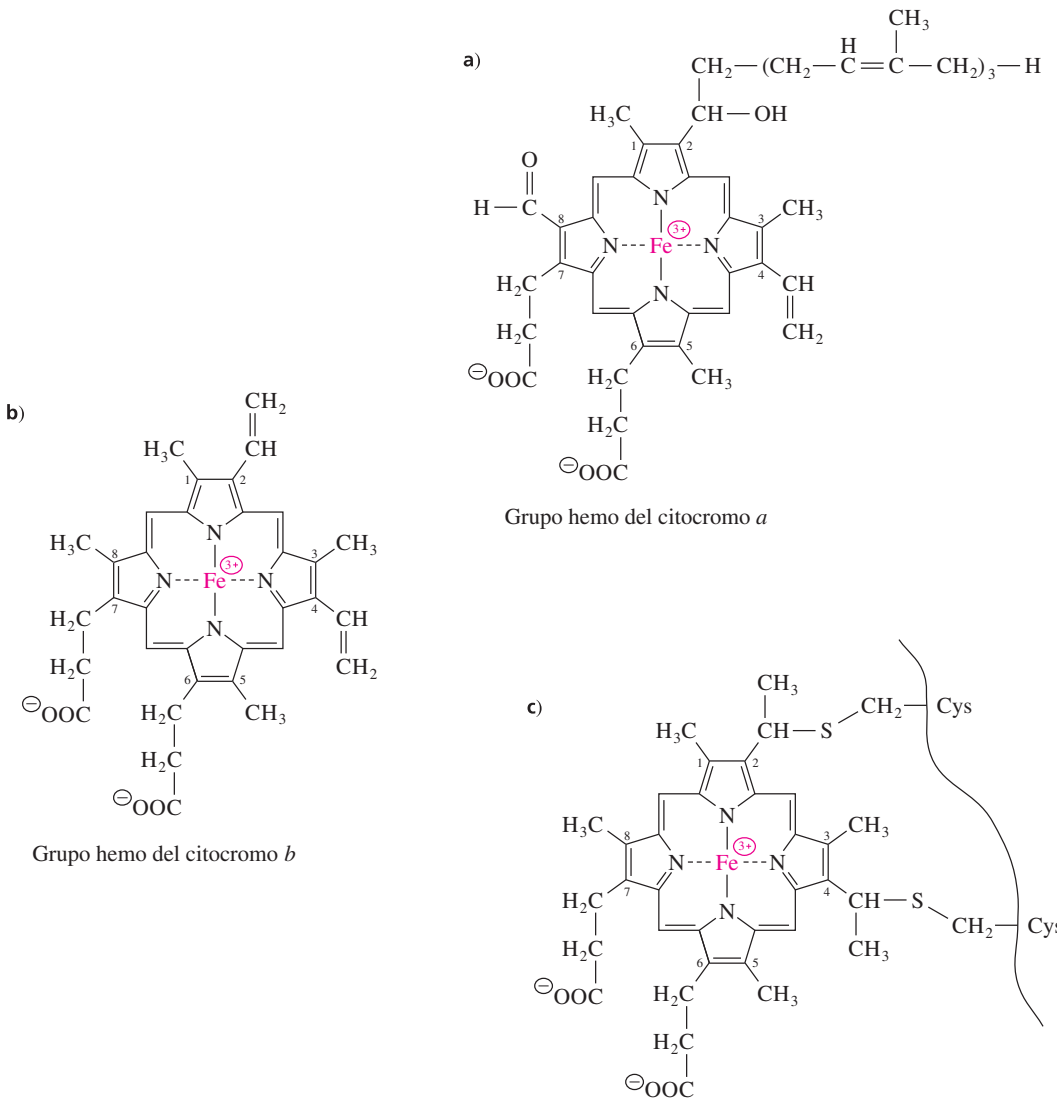


Figura 7.33 ▲
Grupos hemo de **a)** citocromo *a*, **b)** citocromo *b* y **c)** citocromo *c*. Los grupos hemo de los citocromos comparten un sistema de anillo de porfirina, muy conjugado, pero varían los sustituyentes en el anillo.

TABLA 7.3 Máximos de absorción (en nm) de las principales bandas espectrales visibles de los citocromos reducidos

	Banda de absorción		
Proteína hem	α	β	γ
Citocromo *c*	550–558	521–527	415–423
Citocromo *b*	555–567	526–546	408–449
Citocromo *a*	592–604	Ausente	439–443

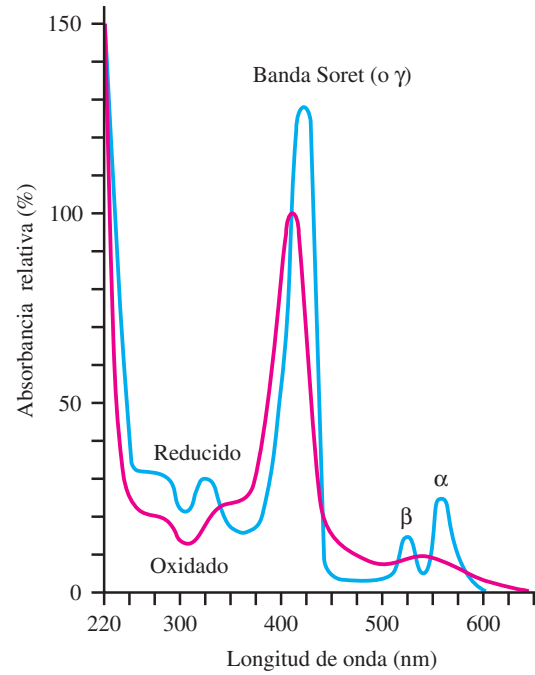


Figura 7.34 ▶
Comparación de los espectros de absorción del citocromo *c* equino oxidado (gris oscuro) y reducido (gris claro). El citocromo reducido tiene tres picos de absorción, indicados con α, β y γ. Al oxidarse, la banda Soret (o γ) disminuye de intensidad y se desplaza a una longitud de onda ligeramente menor, en tanto que los picos α y β desaparecen y queda una sola banda ancha de absorbancia.

Resumen

1. Muchas reacciones catalizadas por enzimas requieren cofactores. Entre los cofactores están iones inorgánicos esenciales y reactivos de transferencia de grupo llamados coenzimas. Las coenzimas pueden actuar como sustratos, o permanecer unidos a las enzimas como grupos prostéticos.
2. Iones inorgánicos, como $K^{\oplus}$, $Mg^{2\oplus}$, $Ca^{2\oplus}$, $Zn^{2\oplus}$ y $Fe^{3\oplus}$, pueden participar en uniones con sustrato o en catálisis.
3. Algunas coenzimas son sintetizadas a partir de metabolitos comunes; otras se derivan de vitaminas, que son compuestos orgánicos que deben suministrarse en pequeñas cantidades en las dietas de humanos y otros animales.
4. Los piridina nucleótidos $NAD^{\oplus}$ y $NADP^{\oplus}$ son coenzimas para deshidrogenasas. La transferencia de un ion hidruro ($H^{\ominus}$) de un sustrato específico reduce al $NAD^{\oplus}$ o $NADP^{\oplus}$ y forma NADH o NADPH, respectivamente, liberando un protón.
5. Las formas de coenzima de la riboflavina, FAD y FMN, están unidas firmemente como grupos prostéticos. El FAD y FMN se reducen por transferencias de hidruro (dos electrones) para formar $FADH_2$ y $FMNH_2$, respectivamente. Las flavin coenzimas reducidas donan electrones uno por uno o dos de una vez.
6. La coenzima A es un derivado de pantotenato y participa en reacciones de transferencia de grupo acilo.
7. La forma coenzima de la tiamina es el pirofosfato de tiamina (TPP), cuyo anillo de tiazolio se enlaza con el aldehído generado al descarboxilar un sustrato de α-cetoácido.
8. El 5′-fosfato de piridoxal es un grupo prostético de muchas enzimas en el metabolismo de aminoácidos. El grupo aldehído en el C-4 del PLP forma una base de Schiff con un sustrato de aminoácido.
9. La biotina, grupo prostético para varias carboxilasas y carboxiltransferasas, está unido en forma covalente a un residuo de lisina en el sitio activo de la enzima.
10. El tetrahidrofolato es un derivado reducido del folato, y participa en la transferencia de unidades de un carbono, en los niveles de oxidación de metanol, formaldehído y ácido fórmico. La tetrahidrobiopterina es un agente reductor en algunas reacciones de hidroxilación.
11. Las formas de coenzima de cobalamina: adenosilcobalamina y metilcobalamina, contienen cobalto y un sistema de anillo corrin. Estas coenzimas participan en unas pocas reorganizaciones intramoleculares, y en reacciones de metilación.
12. La lipoamida es un grupo prostético de complejos multienzimáticos de α-cetoácido deshidrogenasa, y acepta un grupo acilo para formar un tioéster.
13. Las cuatro vitaminas liposolubles, o lípidas, son: A, D, E y K. Estas vitaminas tienen diversas funciones.
14. La ubiquinona es un portador de electrones liposoluble en lípidos que transfiere electrones, de uno en uno o dos a la vez.
15. Algunas proteínas, como la proteína portadora de acilo y la tiorredoxina, funcionan como coenzimas en reacciones de transferencia de grupo o en reacciones de oxidación-reducción, donde el grupo transferido es hidrógeno o un electrón.
16. Los citocromos son proteínas coenzimas pequeñas, con contenido de hemo, que participan en el transporte de electrones. Se diferencian por las bandas de absorción en sus espectros.

Problemas

1. Para cada una de las siguientes reacciones catalizadas por enzimas, determine el tipo de reacción y la coenzima que probablemente participe.

a) $CH_3-\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}}-COO^{\ominus} \longrightarrow CH_3-\overset{\displaystyle O}{\overset{\|}{C}}-COO^{\ominus}$

b) $CH_3-CH_2-\overset{\displaystyle O}{\overset{\|}{C}}-COO^{\ominus} \longrightarrow CH_3-CH_2-\overset{\displaystyle O}{\overset{\|}{C}}-H + CO_2$

c) $CH_3-\overset{\displaystyle O}{\overset{\|}{C}}-S\text{-}CoA + HCO_3^{\ominus} + ATP \longrightarrow {}^{\ominus}OOC-CH_2-\overset{\displaystyle O}{\overset{\|}{C}}-S\text{-}CoA + ADP + P_i$

d) ${}^{\ominus}OOC-\underset{\displaystyle CH_3}{\underset{|}{CH}}-\overset{\displaystyle O}{\overset{\|}{C}}-S\text{-}CoA \longrightarrow {}^{\ominus}OOC-CH_2-CH_2-\overset{\displaystyle O}{\overset{\|}{C}}-S\text{-}CoA$

e) $CH_3-\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}}-TPP + HS\text{-}CoA \longrightarrow CH_3-\overset{\displaystyle O}{\overset{\|}{C}}-S\text{-}CoA + TPP$

2. Indique cuáles coenzimas:
a) participan como reactivos de oxidación-reducción
b) funcionan como portadoras de acilo
c) transfieren grupos metilo
d) transfieren grupos hacia aminoácidos y desde éstos
e) intervienen en reacciones de carboxilación o de descarboxilación

3. En la oxidación de lactato a piruvato por la lactato deshidrogenasa (LDH), se reduce $NAD^{\oplus}$ en un proceso de transferencia de dos electrones a partir de lactato. Ya que del lactato también se eliminan dos protones ¿es correcto escribir que $NADH_2$ es la forma reducida de la coenzima? Explique por qué.

$$H_3C-\underset{\displaystyle H}{\underset{|}{\overset{\displaystyle O}{\overset{|}{C}}}}-COO^{\ominus} \xrightarrow{LDH} H_3C-\overset{\displaystyle O}{\overset{\|}{C}}-COO^{\ominus}$$

L-Lactato — Piruvato

4. La succinato deshidrogenasa requiere FAD para catalizar la oxidación de succinato a fumarato en el ciclo del ácido cítrico. Dibuje el sistema anular de isoaloxazina en el cofactor que resulta de la oxidación de succinato a fumarato, e indique cuáles hidrógenos del $FADH_2$ faltan en el FAD.

$${}^{\ominus}OOC-CH_2-CH_2-COO^{\ominus} \longrightarrow$$

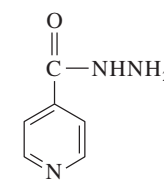
Succinato

$${}^{\ominus}OOC-CH=CH-COO^{\ominus}$$

Fumarato

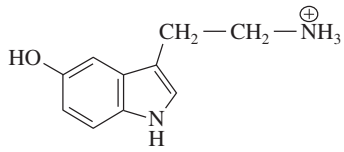
5. ¿Cuál es la propiedad estructural común en el $NAD^{\oplus}$, el FAD y la coenzima A?

6. Ciertos nucleófilos se pueden *adicionar* al C-4 del anillo de nicotinamida en el $NAD^{\oplus}$, en forma parecida a la adición de un hidruro en la reducción de $NAD^{\oplus}$ a NADH. La isoniazida es el medicamento que más se usa para el tratamiento de la tuberculosis. Con estudios de rayos X se ha demostrado que la isoniazida inhibe una enzima básica en la bacteria de la tuberculosis, donde se forma un aducto covalente entre el carbonilo de la isoniazida y la posición 4′ del anillo de nicotinamida en una molécula enlazada de $NAD^{\oplus}$. Dibuje la estructura de este aducto inhibidor de NAD-isoniazida.

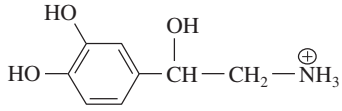


Isoniazida

7. Una deficiencia de vitamina B_6 en los humanos puede causar irritabilidad, nerviosismo, depresión y, a veces, convulsiones. Estos síntomas pueden ser el resultado de mayores concentraciones de los neurotransmisores serotonina y norepinefrina, que son derivados metabólicos del triptófano y la tirosina, respectivamente. ¿De qué manera podría una deficiencia de vitamina B_6 causar menores concentraciones de serotonina y norepinefrina?

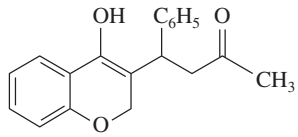


Serotonina



Norepinefrina

8. La wafarina se usa para matar roedores y es tóxica para los animales en general, porque produce una hemorragia interna anormal. Puede interferir con la acción de cierta coenzima derivada de una vitamina, debido a la semejanza estructural de sus sistemas de anillos. Diga el nombre de la coenzima.



9. La anemia macrocítica es una enfermedad en la que los glóbulos rojos maduran con lentitud, debido a una menor velocidad de síntesis de ADN. Los glóbulos rojos son anormalmente grandes (macrocíticos) y se rompen con más facilidad. ¿Cómo podría una deficiencia de ácido fólico causar esta anemia?

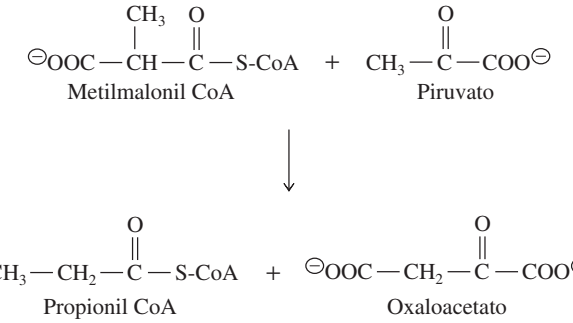
10. Un paciente que padece aciduria metilmalónica (altas concentraciones de ácido metilmalónico) tiene elevadas concentraciones de homocisteína y bajas de metionina en los glóbulos rojos y en los tejidos. Las concentraciones de ácido fólico son normales.

a) ¿De qué vitamina es probable que haya deficiencia?
b) ¿Cómo podría esta deficiencia producir los síntomas descritos anteriormente?
c) ¿Por qué es más probable que esta deficiencia vitamínica se presente en una persona que tenga una dieta vegetariana?

11. La alcohol deshidrogenasa (ADH) de las levaduras es una metaloenzima que cataliza la oxidación de etanol a acetaldehído, dependiente de $NAD^{\oplus}$. El mecanismo de la ADH de levadura es parecido al de la lactato deshidrogenasa (LDH, figura 7.9), excepto que el ion zinc de la ADH ocupa el lugar de His-195 en la LDH.

a) Trace un mecanismo de la oxidación de etanol a acetaldehído por ADH de levadura.
b) ¿Requiere la ADH un residuo análogo a Arg-171 en la LDH?

12. En las reacciones de transcarboxilación dependiente de biotina, una enzima transfiere un grupo carboxilo entre sustratos, en un proceso de dos pasos, sin necesidad de ATP ni de bicarbonato. La reacción catalizada por la enzima metilmalonil CoA-piruvato transcarboxilasa es la que se ve abajo. Trace las estructuras de los productos que se esperan en el primer paso de la reacción.



Metilmalonil CoA + Piruvato

Propionil CoA + Oxaloacetato

13. a) La histamina se produce a partir de la histidina por la acción de una descarboxilasa. Dibuje la aldimina externa producida por la reacción de la histidina y del fosfato de piridoxal en el sitio activo de la histidina descarboxilasa.

b) Ya que la racemización de aminoácidos por enzimas dependientes de PLP procede vía la formación de base de Schiff, ¿la racemización de la L-histidina a D-histidina se produciría durante la reacción de la histidina descarboxilasa?

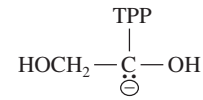
14. a) El pirofosfato de tiamina es una coenzima para reacciones de descarboxilación oxidante, donde el carbono del carbonilo cetónico se oxida y forma un ácido, o un derivado de ácido. La oxidación se efectúa por eliminación de dos electrones de un carbanión estabilizado por resonancia. ¿Cuál es el mecanismo de la reacción: piruvato + HS-CoA → acetil-CoA + CO_2, iniciando a partir del carbanión estabilizado que se forma después de la descarboxilación (figura 7.15) (por ejemplo, un tioéster en el siguiente caso)?

b) La piruvato deshidrogenasa (PDH) es un complejo enzimático que cataliza la descarboxilación oxidante de piruvato a acetil CoA y CO2, en una reacción de varias etapas. Los pasos de oxidación y de transferencia de grupo acetilo requieren TPP y ácido lipoico, además de otras coenzimas. Trace las estructuras químicas de las moléculas en los dos pasos siguientes de la reacción de PDH.

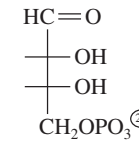
HETPP + lipoamida → acetil-TPP + dihidrolipoamida →

TPP + acetil-dihidrolipoamida

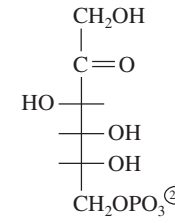
c) En una reacción de la enzima transcetolasa, dependiente de TPP, el carbanión estabilizado por resonancia que se ve al lado se genera como compuesto intermedio. Este compuesto interviene después en una reacción de condensación (que resulta en la formación de un enlace C—C) con el grupo aldehído del 4-fosfato de eritrosa (E4P), para formar 6-fosfato de fructosa (F6P). Partiendo del carbanión, indique un mecanismo de esta reacción de transcetolasa. (A veces, las proyecciones de Fischer de las estructuras de carbohidratos se dibujan como se ve aquí).



Intermedio



E4P



F6P

Lecturas seleccionadas

Iones metálicos

Berg, J. M. (1987). Metal ions in proteins: structural and functional roles. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 52:579-585.* Clasifica a las metaloproteínas en cuatro tipos, de acuerdo con las propiedades estáticas o dinámicas de oxidación-reducción y de coordinación de los iones metálicos.

Rees, D. C. (2002). Great metalloclusters in enzymology. *Annu. Rev. Biochem.* 71:221-246.

Cofactores específicos

Banerjee, R. y Ragsdale, S. W. (2003). The many faces of vitamin B_{12}: catalysis by cobalamin-dependent enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 72:209-247.

Bellamacina, C. R. (1996). The nicotinamide dinucleotide binding motif: a comparison of nucleotide binding proteins. *FASEB J.* 10:1257-1268. Describe deshidrogenasas que en su mayor parte tienen estructuras como las de la lactato deshidrogenasa o la glutatión reductasa.

Blakley, R. L. y Benkovic, S. J., eds. (1985). *Folates and Pterins,* Vol. 1 y Vol. 2. (New York: John Wiley & Sons). Un repaso detallado de las coenzimas pterina .

Chiang, P. K., Gordon, R. K., Tal. J., Zeng, G. C., Doctor, B. P., Pardhasaradhi, K. y McCann, P. P. (1996). S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J.* 10:471-480.

Coleman, J. E. (1992). Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 61:897-946. Describe las numerosas enzimas y factores de transcripción que contienen zinc.

Ghisla, S. y Massey, V. (1989). Mechanisms of flavoprotein-catalyzed reactions. Eur. J. Biochem. 181:1-17. Presenta los mecanismos mejor estudiados de estas enzimas.

Hayashi, H., Wada, H., Yoshimura, T., Esaki, N. y Soda, K. (1990). Recent topics in pyridoxal 5′-phosphate enzyme studies. *Annu. Rev. Biochek.* 59:87-110.

Jordan, F. (1999). Interplay of organic and biological chemistry in understanding coenzyme mechanisms: example of thiamin diphosphate-dependent decarboxylations of 2-oxo acids. *FEBS Lett.* 457:298-301. Relaciona la estructura de las enzimas con la necesidad de modelos químicos adecuados.

Jordan, F., Li, H. y Brown, A. (1999). Remarkable stabilization of zwitterionic intermediates may account for a billion-fold rate acceleration by thiamin diphosphate-dependent decarboxylases. *Biochemistry* 38:6369-6373.

Knowles, J. R. (1989). The mechanism of biotin-dependent enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 58:195-221.

Ludwig, M. L. y Matthews, R. G. (1997). Structure-based perspectives on B_{12}-dependent enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 66:269-313. Descripción del mecanismo de transferencias de grupo metilo mediadas por cobalamina, y de reorganizaciones del esqueleto de carbonos.

Palfey, B. A., Moran, G. R., Entsch, B., Ballou, D. P. y Massey, V. (1999). Substrate recognition by "password" in *p*-hydroxybenzoate hydroxylase. *Biochemistry* 38:1153-1158.

Motivos enlazantes con NAD

Bellamacina, C. R. (1996). The nicotinamide dinucleotide binding motif: a comparison of nucleotide binding proteins. *FASEB. J.* 10:1257-1269. Compara las estructuras de varias deshidrogenasas.

Rossmann, M. G., Liljas, A., Brändén, C.-I. y Banaszak, L. J. (1975). Evolutionary and structural relationships among dehydrogenases. En *The Enzymes.* Vol. II, parte A, 3ª ed., P. D. Boyer, ed. (New York: Academic Press), pp. 61-102. Descripción de los motivos enlazantes con NAD de cuatro deshidrogenasas.

Wilks, H. M., Hart. K. W., Feeney, R., Dunn, C. R., Muirhead, H., Chia, W. N., Barstow, D. A., Atkinson, T., Clarke, A. R. y Holbrook, J. J. (1998). Una malato deshidrogenasa específica, muy activa, rediseñando un marco de lactato deshidrogenasa. *Science* 242:1541-1544. Mutagénesis específica del sitio de lactato deshidrogenasa de *Bacillus stearothermophilus.*

8

capítulo
ocho

Carbohidratos

Los carbohidratos (también llamados sacáridos), con base en su masa, son la clase más abundante de moléculas biológicas en la Tierra. Aunque todos los organismos pueden sintetizar carbohidratos, muchos de ellos se producen en organismos fotosintéticos, como bacterias, algas y plantas. Estos organismos convierten la energía solar en energía química, que a continuación se usa para fabricar carbohidratos a partir de dióxido de carbono. Los carbohidratos tienen varios papeles fundamentales en los organismos vivos. En animales y plantas, los carbohidratos poliméricos funcionan como moléculas almacenadoras de energía. Los animales pueden ingerir carbohidratos, que a continuación se puedan oxidar para obtener energía para los procesos metabólicos. También se encuentran carbohidratos poliméricos en las paredes celulares y en los recubrimientos protectores de muchos organismos; otros carbohidratos polímeros son moléculas marcadoras que permiten que un tipo de célula reconozca e interaccione con otro tipo. Los derivados de carbohidratos se encuentran en varias moléculas biológicas, como algunas coenzimas (capítulo 7) y en los ácidos nucleicos ADN y ARN (capítulo 19).

Se pueden describir los carbohidratos por la cantidad de unidades monómeras que contienen. Los **monosacáridos** son las unidades más pequeñas de estructura de carbohidratos. El nombre *carbohidrato*, "hidrato de carbono", indica que su fórmula empírica es $(CH_2O)_n$, donde n es 3 o más (en general n es 5 o 6, pero puede ser hasta 9). Los **oligosacáridos** son polímeros con dos hasta unos 20 residuos de monosacárido. Los oligosacáridos más comunes son los disacáridos, formados por dos residuos de monosacárido unidos. Los **polisacáridos** son polímeros que contienen muchos (en general más de 20) residuos de monosacárido. Los oligosacáridos y los polisacáridos no tienen la fórmula empírica $(CH_2O)_n$, porque durante la formación del polímero se elimina agua. El término *glucano* (o *glicano)* es uno más general que se usa para los carbohidratos polímeros. Puede indicar un polímero de azúcares idénticos (homoglicano) o de distintos azúcares (heteroglicano).

Los glucoconjugados son derivados de carbohidrato en los que una o más cadenas de carbohidrato están unidas en forma covalente a un péptido, una proteína o un lípido. Esos derivados comprenden los proteoglicanos, peptidoglicanos, glucoproteínas y glucolípidos.

Arriba: Gorgojo de la harina. Los exoesqueletos de los insectos contienen quitina, una homoglicana.

Nota: En medicina y ciencias relacionadas, se acepta glico- y gluco- como prefijos y se refieren a cualquier azúcar en forma de acetal; en especial el acetal de la glucosa es un glucósido. Véase la sección 8.5 (pág. 234).

En este capítulo se describirá la nomenclatura, estructura y funciones de los monosacáridos, los disacáridos y los homoglicanos principales: almidón, glucógeno, celulosa y quitina. A continuación se expondrán los proteoglicanos, peptidoglicanos y glucoproteínas, todos los cuales contienen cadenas de heteroglicanos.

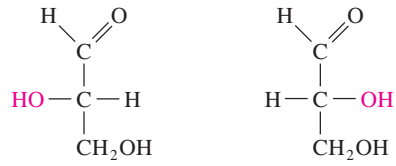
La fotosíntesis se describe con detalle en el capítulo 15.

8.1 La mayor parte de los monosacáridos son compuestos quirales

Los monosacáridos son sólidos blancos, cristalinos y solubles en agua que tienen sabor dulce. Entre los ejemplos están la glucosa y la fructosa. Desde el punto de vista químico, los monosacáridos son polihidroxi aldehídos o **aldosas**, o polihidroxi cetonas o **cetosas**. Se clasifican por el tipo de grupo carbonilo y por la cantidad de átomos de carbono. Como regla, se usa el sufijo *-osa* para dar nombre a los carbohidratos, aunque hay varias excepciones. Todos los monosacáridos tienen al menos tres átomos de carbono. Uno de ellos es el carbono carbonílico, y cada uno de los restantes tiene un grupo hidroxilo. En las aldosas, el átomo de carbono más oxidado se designa como C-1 y se pone en la parte superior de una proyección de Fischer. En las cetosas, el átomo de carbono más oxidado suele ser el C-2.

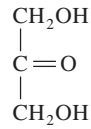
Puede repasar las proyecciones de Fischer en la sección 1.3B.

a)



L-Gliceraldehído D-Gliceraldehído

b)



Dihidroxiacetona

◀ Figura 8.1
Proyecciones de Fischer de: **a)** gliceraldehído y **b)** dihidroxiacetona. Las designaciones L (de *laevo*, izquierda) y D (de *dexter*, derecha) para el gliceraldehído se refieren a la configuración del grupo hidroxilo en el carbono quiral (C-2). La dihidroxiacetona es aquiral.

Los monosacáridos más pequeños son **triosas**, azúcares con tres carbonos. Los compuestos con uno o dos carbonos que tienen la fórmula general $(CH_2O)_n$ no tienen las propiedades típicas de los carbohidratos (como sabor dulce y la capacidad de cristalizar). La triosa aldehídica, o aldotriosa, es el gliceraldehído (figura 8.1a). Como su carbono central, C-2, tiene cuatro grupos diferentes unidos a él, el gliceraldehído es quiral (sección 3.1). La triosa cetónica, o cetotriosa, es la dihidroxiacetona (figura 8.1b), que es aquiral: no tiene átomo de carbono asimétrico. Todos los demás monosacáridos son versiones de estos dos azúcares con cadenas más larga, y son quirales.

En la figura 8.2 se observan los estereoisómeros del D- y el L-gliceraldehído como modelos de bolas y palillos. Las moléculas quirales son ópticamente activas, esto es, hacen girar el plano de polarización de la luz polarizada. La convención de designar a los isómeros como D y L se basó originalmente en las propiedades ópticas del gliceraldehído. La forma del gliceraldehído que causaba la rotación hacia la derecha (dextrorrotatoria) se designó como D; la que causaba la rotación hacia la izquierda (levorrotatoria) se designó como L. Los conocimientos sobre estructura eran limitados cuando se estableció esta convención a finales del siglo XIX, por lo que se asignaron configuraciones para los enantiómeros del gliceraldehído en forma arbitraria y con 50% de probabilidad de error. A mediados del siglo XX, mediante experimentos cristalográficos con rayos X se demostró que las asignaciones estructurales originales eran correctas.

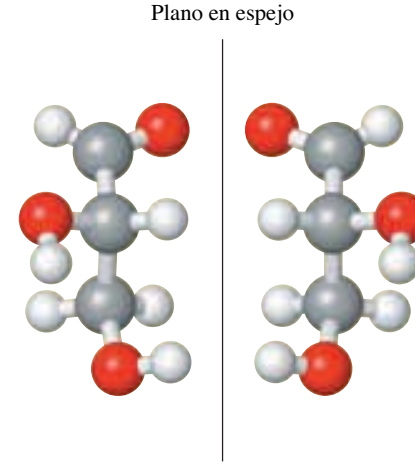
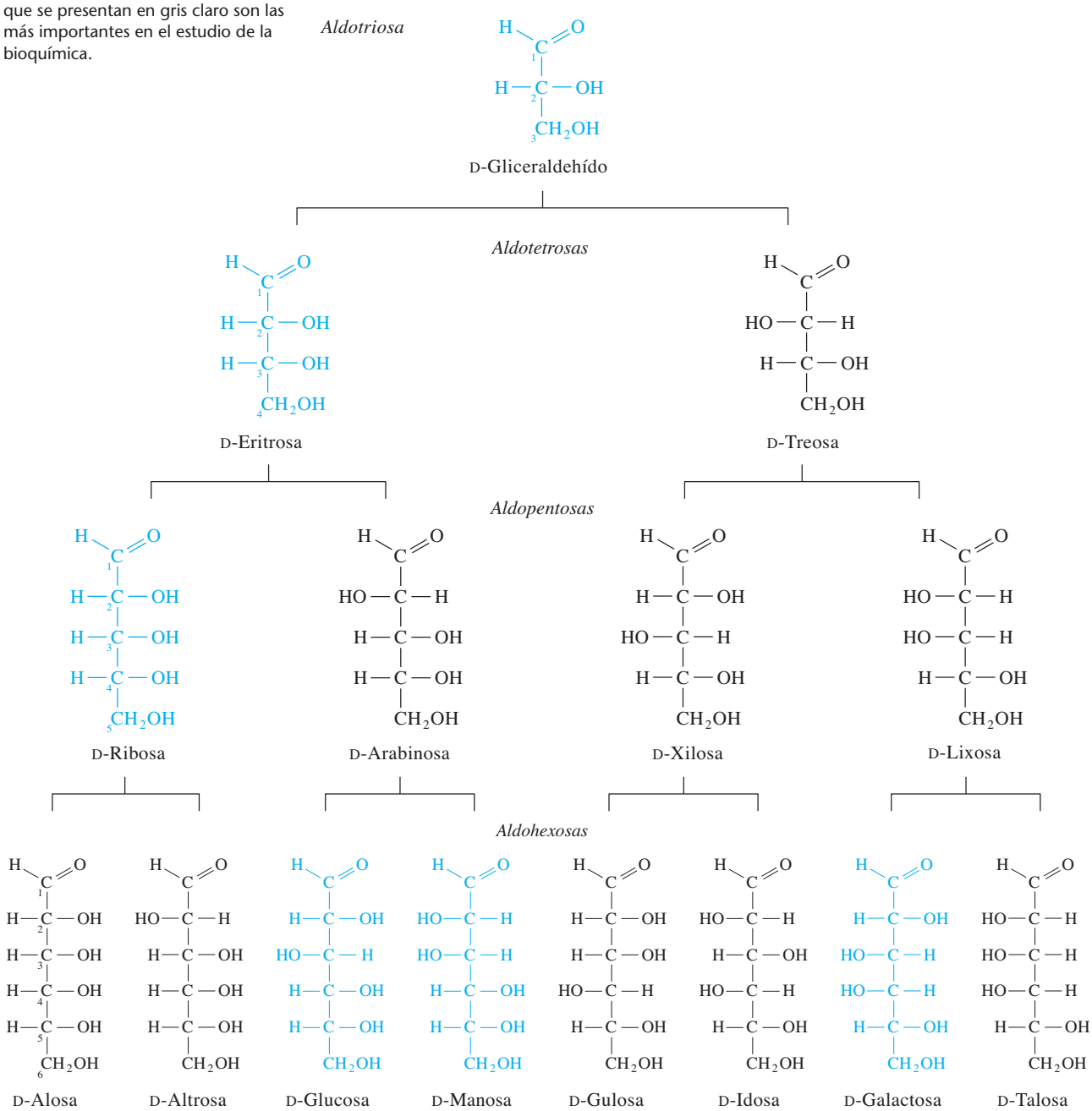


Figura 8.2 ▲
Vistas de L-gliceraldehído (izquierda) y D-gliceraldehído (derecha).

Se puede considerar que las aldosas y las cetosas más largas son prolongaciones del gliceraldehído y la dihidroxiacetona, respectivamente, y que los grupos quirales H—C—OH están insertados entre el carbono carbonílico y el grupo alcohol primario. La figura 8.3 muestra la lista completa de los nombres y estructuras de las tetrosas (aldosas de cuatro carbonos), pentosas (aldosas de cinco carbonos) y hexosas (aldosas de seis carbonos) relacionadas con el D-gliceraldehído. La mayoría de los organismos no sintetiza a muchos de esos monosacáridos, y volverán a encontrarse de nuevo en este libro.

Los átomos de carbono se numeran a partir del carbono aldehídico, al que se le asigna el número 1. Por convención, se dice que los azúcares tienen la configuración D

Figura 8.3 ▼
Proyecciones de Fischer de D-aldosas con tres a seis carbonos. Las aldosas que se presentan en gris claro son las más importantes en el estudio de la bioquímica.



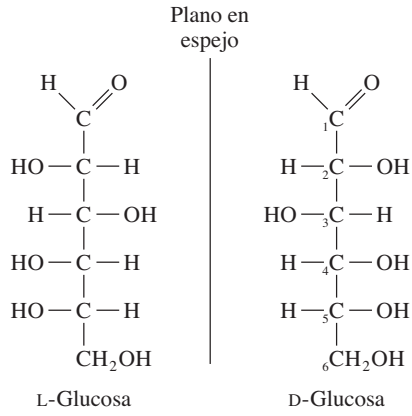


Figura 8.4 ▲
Proyecciones de Fischer para L- y D-glucosa.

cuando la configuración del carbono quiral que tiene el número mayor, o sea el carbono quiral más alejado del carbono carbonílico, es la misma que la del C-2 del D-gliceraldehído (es decir, el grupo —OH está unido a este átomo de carbono en el lado derecho en una proyección de Fischer). A excepción del gliceraldehído (que se usó como patrón), no hay relación predecible entre la configuración absoluta de un azúcar y el que sea dextrorrotatorio o levorrotatorio. El arreglo de los átomos de carbono asimétricos es exclusivo de cada monosacárido y le confiere sus propiedades características.

La mayor parte de los enantiómeros D son los que se sintetizan en las células vivas, y sólo los enantiómeros L de los aminoácidos son más comunes. En consecuencia, no se muestran los enantiómeros L de las 15 aldosas de la figura 8.3. Los pares de enantiómeros son imágenes especulares; en otras palabras, la configuración en el carbono quiral es opuesta. Por ejemplo, los grupos hidroxilo unidos a los átomos 2, 3, 4 y 5 de carbono de la D-glucosa apuntan hacia derecha, izquierda, derecha y derecha, respectivamente, en la proyección de Fischer; los de la L-glucosa apuntan hacia izquierda, derecha, izquierda e izquierda (figura 8.4).

El gliceraldehído, aldosa con tres carbonos, sólo tiene un átomo quiral (C-2) y en consecuencia sólo dos estereoisómeros. Las aldotetrosas tienen cuatro estereoisómeros (D- y L-eritrosa y D- y L-treosa), porque tanto la eritrosa como la treosa poseen dos átomos de carbono quirales. En general, hay 2^n estereoisómeros posibles de un compuesto que tenga n carbonos quirales. Las aldohexosas, que tienen cuatro carbonos quirales, tienen un total de 2^4 o 16 estereoisómeros (las ocho D aldohexosas de la figura 8.3 y sus enantiómeros L).

Cuando las moléculas de azúcar tienen distinta configuración sólo en uno de varios centros quirales, se llaman **epímeros**. Por ejemplo, la D-manosa y la D-galactosa son epímeros de la D-glucosa (en C-2 y C-4, respectivamente), aunque no son epímeros entre sí (figura 8.3).

Las cetosas de cadena larga (figura 8.5) se relacionan con la dihidroxiacetona de la misma manera que las aldosas de cadena larga se relacionan con el gliceraldehído. Una cetosa tiene un átomo de carbono quiral menos que la aldosa con la misma fórmula empírica. Por ejemplo, sólo hay dos estereoisómeros de la única cetotetrosa (D- y L-eritrulosa) y cuatro estereoisómeros de las cetopentosas (D- y L-xilulosa y D- y L-ribulosa). Los nombres de la cetotetrosa y las cetopentosas se forman insertando *-ul-* en el nombre de la aldosa correspondiente. Por ejemplo, la cetosa xilulosa corresponde a la aldosa xilosa. Sin embargo, esta nomenclatura no se aplica a las cetohexosas (tagatosa, sorbosa, psicosa y fructosa), que tienen nombres triviales.

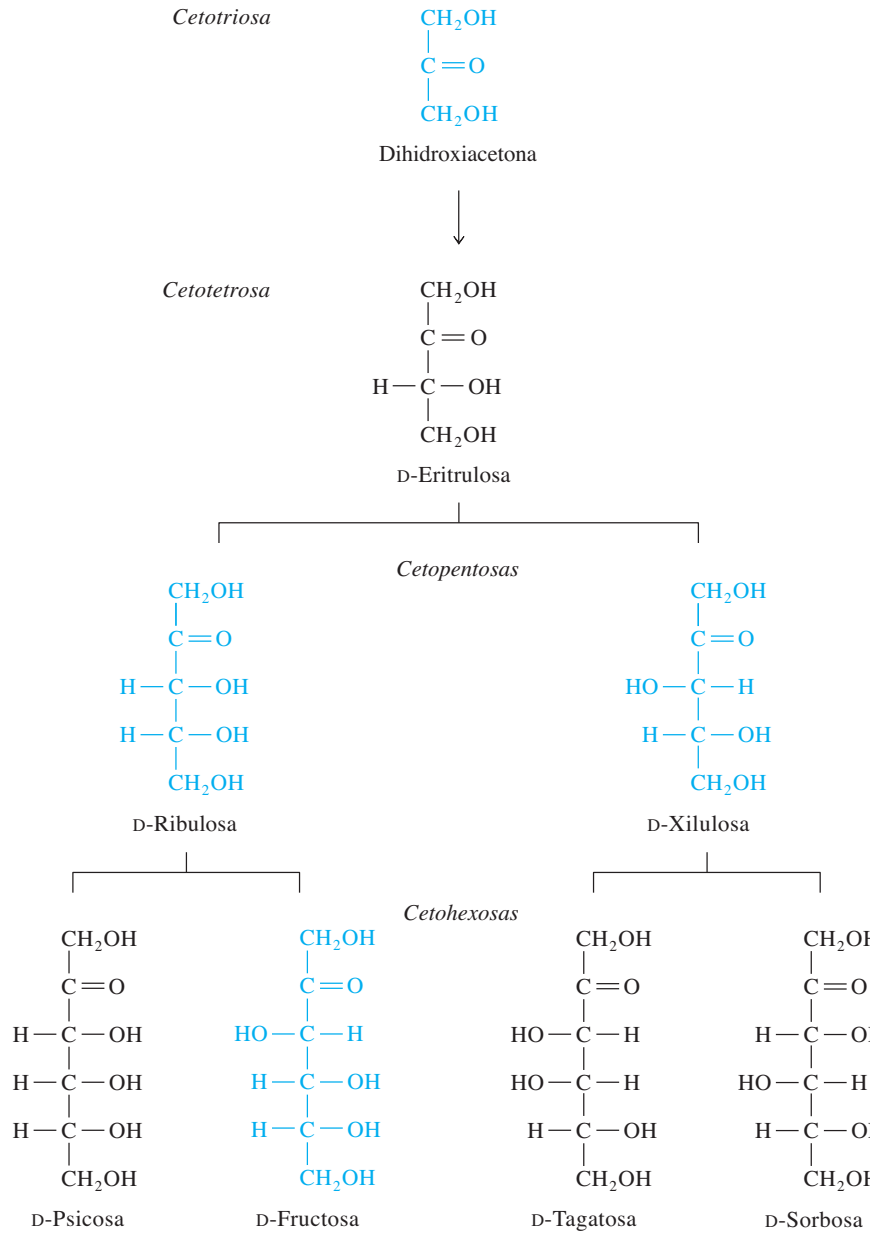
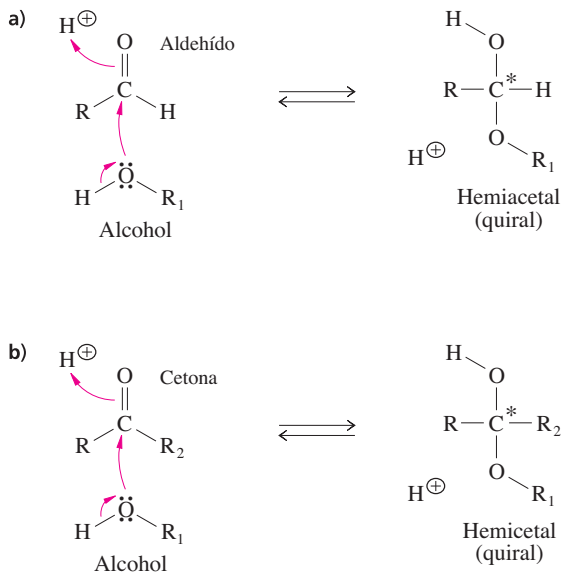


Figura 8.5 ▲
Proyecciones de Fischer para las tres D-cetosas de tres a seis carbonos. Las cetosas que se muestran en gris claro son las más importantes en el estudio de bioquímica.

8.2 Ciclación de aldosas y hexosas

El comportamiento óptico de algunos monosacáridos parece indicar que tienen un átomo de carbono más que lo que se ve en las estructuras de las figuras 8.3 y 8.5. Por ejemplo, la D-glucosa tiene dos formas que contienen cinco (no cuatro) carbonos asimétricos. La causa de esta asimetría adicional es una reacción de ciclación intramolecular, que produce un nuevo centro quiral en el átomo de carbono del grupo carbonilo. Esta ciclación se parece a la reacción de un alcohol con un aldehído para formar un hemiacetal, o con una cetona para formar un hemicetal (figura 8.6).



◀ Figura 8.6
a) Reacción de un alcohol con un aldehído para formar un hemiacetal. **b)** Reacción de un alcohol con una cetona para formar un hemicetal. Los asteriscos indican los centros quirales recién formados.

El carbono carbonílico de una aldosa que contenga al menos cinco átomos de carbono, o de una cetosa que contenga al menos seis átomos de carbono, puede reaccionar con un grupo hidroxilo intramolecular y formar un hemiacetal cíclico o un hemicetal cíclico, respectivamente. El átomo de oxígeno del grupo hidroxilo reaccionante se convierte en miembro de las estructuras anulares con cinco o seis miembros.

Como se parece al compuesto heterocíclico pirano, de seis miembros (figura 8.7a), al anillo con seis miembros de un monosacárido se le llama **piranosa**. De igual modo, como el anillo con cinco miembros de un monosacárido se parece al del furano (figura 8.7b), se le llama **furanosa.** Sin embargo, a diferencia del pirano y del furano, los anillos de los carbohidrato no contienen dobles enlaces.

El carbono más oxidado de un monosacárido ciclado, el que está unido a dos átomos de oxígeno, se llama **carbono anomérico**. En las estructuras de anillo, el carbono anomérico es quiral. Así, la aldosa o cetosa ciclada puede adoptar cualquiera de dos configuraciones (designadas α o β) como se ve en la figura 8.8 para la D-glucosa. A los isómeros α y β se les llama anómeros.

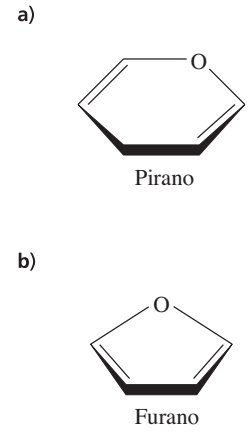


Figura 8.7 ▲
a) Pirano y **b)** Furano.

En solución, las aldosas y las cetosas que forman estructuras anulares están en equilibrio entre sus diversas formas cíclicas y de cadena abierta. Por ejemplo, a 31 °C, la D-glucosa existe como una mezcla en equilibrio de aproximadamente 64% de β-D-glucopiranosa y 36% de α-D-glucopiranosa, con cantidades muy pequeñas de las formas de cadena abierta. De igual modo, la D-ribosa existe como mezcla de 58.5% de β-D-ribopiranosa, 21.5% de α-D-ribopiranosa, 13.5% de β-D-ribofuranosa y 6.5% de α-D-ribofuranosa, con una fracción diminuta con la forma de cadena abierta (figura 8.9, página 229). La abundancia relativa de las diversas formas de monosacárido en el equilibrio refleja las estabilidades relativas de cada forma. Aunque la D-ribosa no sustituida es más estable en la forma de β-piranosa, su estructura en los nucleótidos (sección 8.5c) tiene la forma de β-furanosa.

Las representaciones de anillos que se ven en las figuras 8.8 y 8.9 se llaman proyecciones de Haworth, por Norman Haworth, quien trabajó sobre reacciones de ciclación de carbohidratos y propuso esas representaciones. Una proyección de Haworth indica la estereoquímica en forma adecuada, y se puede relacionar con facilidad con una proyección de Fischer. Un monosacárido cíclico se traza de modo que el carbono anomérico esté en la derecha, y los demás carbonos se numeran en dirección de las manecillas del reloj. Los grupos hidroxilo que apuntan hacia abajo en la proyección de Haworth, lo hacen hacia la derecha del esqueleto de carbonos en la proyección de

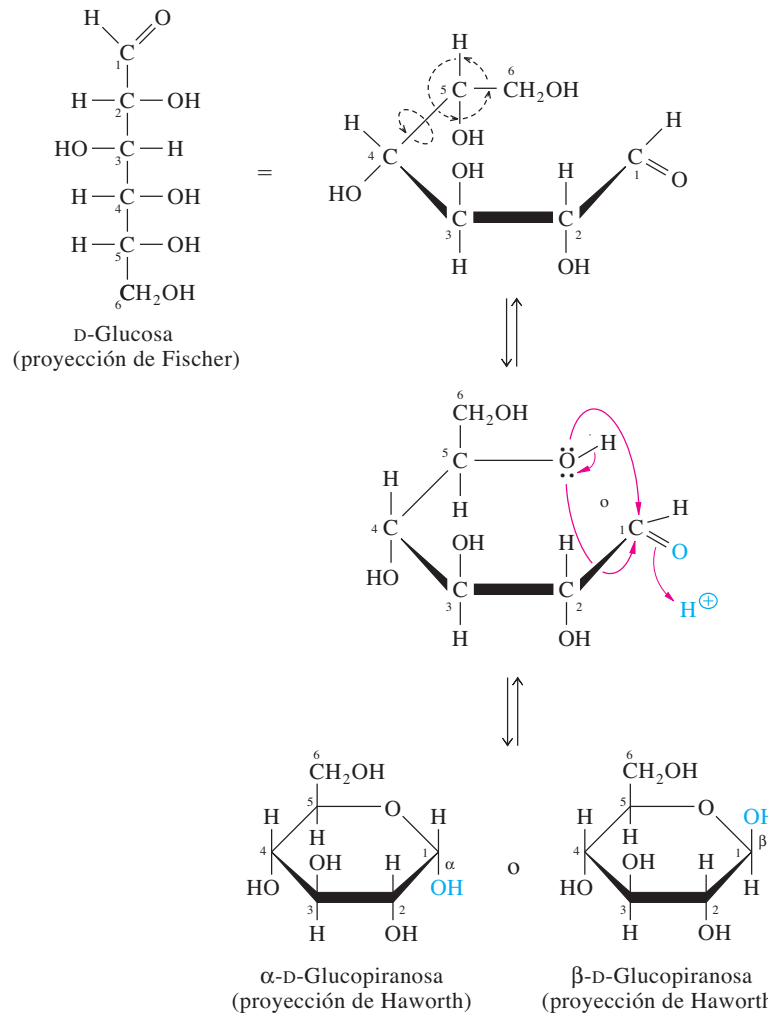


Figura 8.8 ▶
Ciclación de D-glucosa para formar glucopiranosa. La proyección de Fischer (arriba, izquierda) se traza como representación tridimensional (arriba, derecha). La rotación del enlace entre C-4 y C-5 pone al grupo hidroxilo de C-5 cerca del grupo aldehído de C-1. La reacción del grupo hidroxilo de C-5 con un lado de C-1 forma α-D-glucopiranosa; la reacción del grupo hidroxilo con el otro lado forma β-D-glucopiranosa. Los productos de glucopiranosa se muestran como proyecciones de Haworth donde las orillas inferiores del anillo (líneas gruesas) se proyectan frente al plano del papel, y las orillas superiores se proyectan atrás del plano del papel. En el anómero α-D de la glucosa, el grupo hidroxilo en C-1 apunta hacia abajo; en el anómero β-D lo hace hacia arriba.

▶ Sir Walter Norman Haworth (1883-1950) recibió el Premio Nobel de Química en 1937 por su trabajo sobre las estructuras de los carbohidratos y la síntesis de la vitamina C.

Fischer, en tanto que los grupos hidroxilo que apuntan hacia arriba en la proyección de Haworth lo hacen hacia la izquierda en la proyección de Fischer. En una proyección de Haworth, la configuración del átomo de carbono anomérico se indica con α si su grupo hidroxilo está al lado contrario del anillo respecto del grupo —CH_2OH de C-5. Es β si su grupo hidroxilo está en el mismo lado del anillo que el grupo —CH_2OH. C-5 es el centro quiral que distingue los azúcares D y L. En las proyecciones de Haworth de los azúcares D, el grupo —CH_2OH siempre apunta hacia arriba. En la α-D-glucopiranosa, el grupo hidroxilo en el carbono anomérico apunta hacia abajo; en la β-D-glucopiranosa apunta hacia arriba.

Con frecuencia, los monosacáridos se representan en la forma de α- o β-D-furanosa, o en la forma α- o β-D-piranosa. Sin embargo, el lector debe recordar que las formas anómeras de los azúcares con cinco y seis carbonos están en rápido equilibrio. En este capítulo, y en el resto del libro, se representará a los azúcares en la forma anomérica correcta, cuando se conozca. Se llamará azúcares en una forma no específica (por ejemplo, glucosa) cuando se describa una mezcla en equilibrio de las diversas formas anómeras, igual que las formas de cadena abierta. Sin embargo, cuando se describa una forma específica de un azúcar, se denominará con precisión (por ejemplo, β-D-glucopiranosa). Asimismo, ya que en la naturaleza predominan los enantiómeros D de los carbohidratos, siempre se supondrá que un carbohidrato tiene la configuración D a menos que se indique otra cosa.

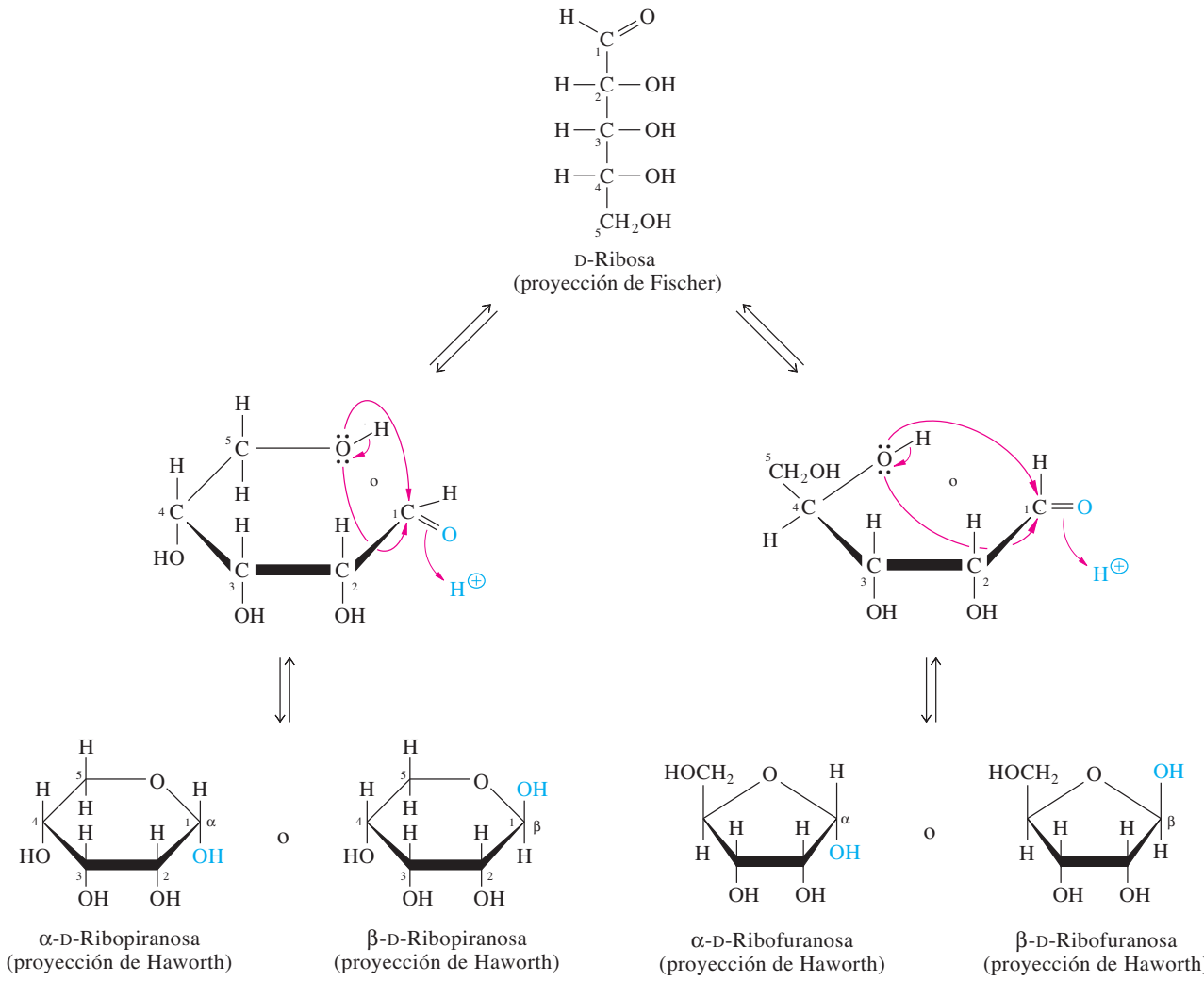
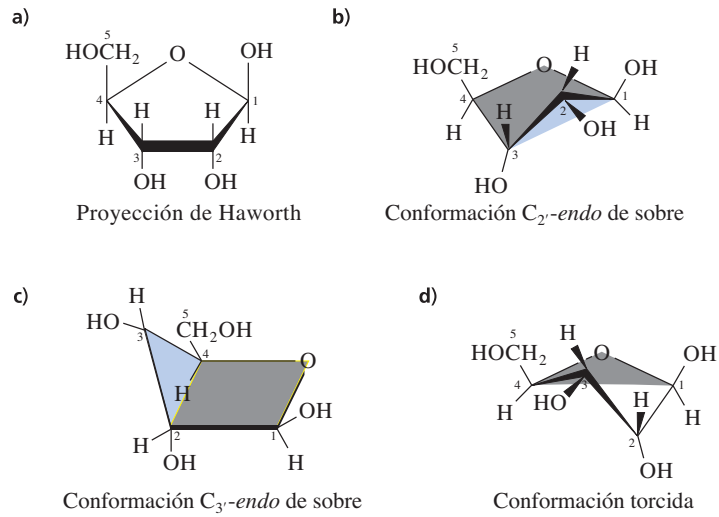


Figura 8.9 ▲
Ciclación de D-ribosa para formar α- y β-D-ribopiranosa y α- y β-D-ribofuranosa.

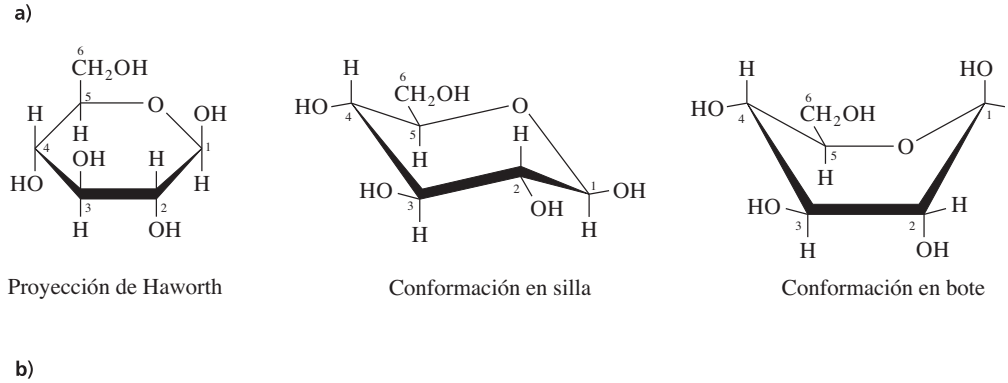
8.3 Conformaciones de los monosacáridos

Debido a su simplicidad, las proyecciones de Haworth se usan con frecuencia en bioquímica. Esas fórmulas muestran la configuración de los átomos y los grupos en cada átomo de carbono de la columna vertebral del azúcar. Sin embargo, la geometría de los átomos de carbono de un anillo de monosacárido es tetraédrica (ángulos de enlace cercanos a 110°), por lo que en realidad los anillos de monosacárido no son planos. Los monosacáridos cíclicos pueden tener diversas conformaciones, o formas tridimensionales que tienen la misma configuración. Los anillos de furanosa adoptan conformaciones de sobre en las que uno de los cinco átomos del anillo (C-2 o C-3) está fuera del plano, y los cuatro restantes son aproximadamente coplanares (figura 8.10). Las furanosas también pueden formar conformaciones torcidas, donde dos de los cinco átomos del anillo están fuera del plano, uno a cada lado del plano formado por los otros tres átomos. La estabilidad relativa de cada confórmero depende del grado de interferencia estérica entre los grupos hidroxilo. Los diversos confórmeros de monosacáridos no sustituidos pueden convertirse rápidamente entre sí.

Figura 8.10 ▶
Conformaciones de la β-D-ribofuranosa. **a)** Proyección de Haworth. **b)** Conformación C2′-endo de sobre. **c)** Conformación C3′-endo de sobre. **d)** Conformación torcida. En la conformación C2′-endo, C-2 está arriba del plano definido por C-1, C-3, C-4 y el oxígeno en el anillo. En la conformación C3′-endo, C-3 está arriba del plano definido por C-1, C-2, C-4 y el oxígeno del anillo. En la conformación torcida, C-3 está arriba de C-2 y C-2 está abajo del plano definido por C-1, C-4 y el oxígeno del anillo. Los planos se indican en gris oscuro.



Los anillos de piranosa tienden a asumir una de dos conformaciones, la de silla o la de bote (figura 8.11). Para cada piranosa hay dos confórmeros distintos en silla, y seis confórmeros distintos en bote. Las conformaciones en silla minimizan la repulsión estérica entre los sustituyentes del anillo, y en general son más estables que las conformaciones en bote. Los sustituyentes —H, —OH y —CH_2OH de un anillo de piranosa en la conformación en silla pueden ocupar dos posiciones diferentes. En la posición axial, el sustituyente está en el plano del anillo. En las piranosas, la posición ecuatorial del sustituyente está en el plano del anillo. En las piranosas, cinco sustituyentes son axiales y cinco son ecuatoriales. El que un grupo sea axial o ecuatorial depende de cuál átomo de



b)

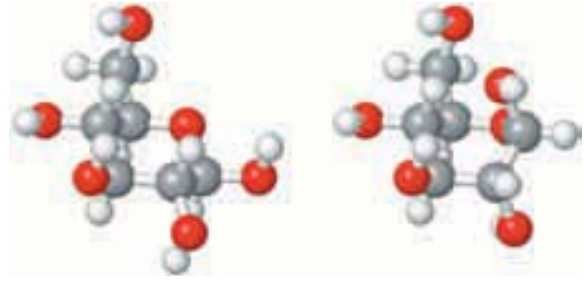


Figura 8.11 ▲
Conformación de la β-D-glucopiranosa. **a)** Proyección de Haworth, conformación en silla y conformación en bote. **b)** Modelo de bolas y palillos de una conformación en silla (izquierda) y una en bote (derecha).

carbono (C-1 o C-4) sobresalga arriba del plano del anillo cuando está en la conformación en silla. La figura 8.12 muestra los dos distintos confórmeros en silla de la β-D-glucopiranosa. La conformación más estable es la que tiene los sustituyentes más voluminosos en el anillo en posición ecuatorial (estructura superior). De hecho, esta conformación de la β-D-glucosa tiene la mínima tensión estérica de todas las aldohexosas. A veces, los anillos de piranosa están forzados a adoptar conformaciones un poco diferentes, como la de media silla, inestable, adoptada por un residuo de polisacárido en el sitio activo de la lisozima (sección 6.6).

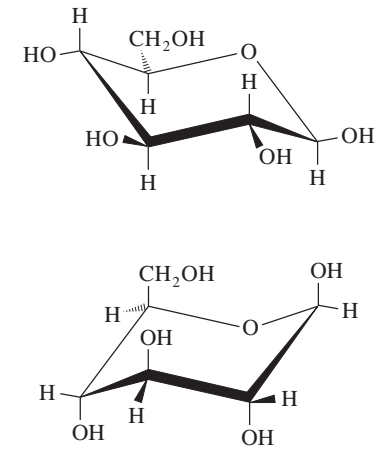


Figura 8.12 ▲
Los dos confórmeros en silla de la β-D-glucopiranosa. El confórmero de arriba es más estable.

8.4 Derivados de los monosacáridos

Hay muchos derivados de los monosacáridos básicos que ya se describieron en las secciones anteriores. Entre estos derivados están los monosacáridos polimerizados, como los oligosacáridos y los polisacáridos, igual que varias clases de compuestos no polimerizados. En esta sección se presentarán algunos derivados de monosacárido, incluyendo fosfatos de azúcar, desoxi y aminoazúcares, azúcares alcoholes, azúcares ácidos y el ácido ascórbico (vitamina C).

Igual que otras biomoléculas formadoras de polímeros, los monosacáridos y sus derivados tienen abreviaturas con las que se describen los polisacáridos más complejos. Las abreviaturas aceptadas tienen tres letras, y en algunos casos se les añaden sufijos. En la tabla 8.1 se ven las abreviaturas de algunas pentosas y hexosas, y sus principales derivados. Más adelante, en este capítulo, se utilizarán estas abreviaturas.

A. Fosfatos de azúcar

Los monosacáridos, en las vías metabólicas, con frecuencia se convierten en ésteres de fosfato. En la figura 8.13 se muestran las estructuras de varios fosfatos de azúcar con los que se encontrará al estudiar el metabolismo de los carbohidratos. Los fosfatos de triosa, el 5-fosfato de ribosa y el 6-fosfato de glucosa son ésteres alcohol-fosfato simples. El 1-fosfato de glucosa es un fosfato de hemiacetal, más reactivo que un fosfato de alcohol. La capacidad de la UDP-glucosa para funcionar como donador de glucosilo (sección 7.7) es una prueba de esta reactividad.

B. Desoxiazúcares

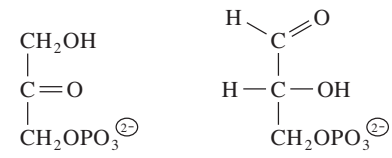
En la figura 8.14 se muestran las estructuras de dos desoxiazúcares. En esos derivados, un átomo de hidrógeno sustituye a uno de los grupos hidroxilo del monosacárido precursor. La 2-desoxi-D-ribosa es un bloque constructivo importante en el ADN. La L-fucosa (6-desoxi-L-galactosa) está muy distribuida en plantas, animales y microorganismos. A pesar de su rara configuración L, la fucosa se deriva metabólicamente de la D-manosa.

C. Aminoazúcares

En varios azúcares, un grupo amino sustituye uno de los grupos hidroxilo del monosacárido precursor. A veces el grupo amino está acetilado. En la figura 8.15 se ven tres ejemplos de aminoazúcares. Los aminoazúcares de la glucosa y la galactosa se suelen presentar en glucoconjugados. El ácido *N*-acetilneuramínico (NeuNAc) se forma a partir de la *N*-acetilmanosamina y piruvato. Cuando este compuesto se cicla y forma una piranosa, el grupo carbonilo en C-2 (de la mitad de piruvato) reacciona con el grupo hidroxilo de C-6. El NeuNAc es un componente importante de muchas glucoproteínas y de una familia de lípidos llamados gangliósidos (sección 9.5). El ácido neuramínico y sus derivados, incluyendo el NeuNAc, tienen el nombre colectivo de ácidos siálicos.

TABLA 8.1 Abreviaturas de algunos monosacáridos y sus derivados

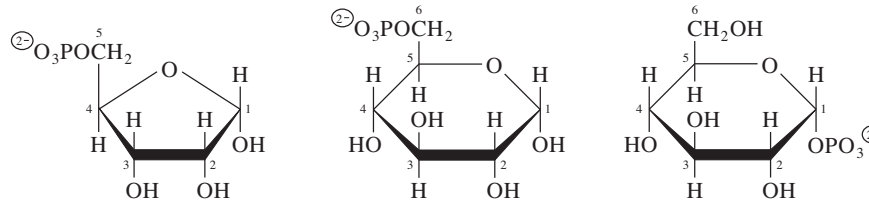
Monosacárido o derivado	Abreviatura
Pentosas	
Ribosa	Rib
Xilosa	Xyl
Hexosas	
Fructosa	Fru
Galactosa	Gal
Glucosa	Glc
Manosa	Man
Desoxiazúcares	
Abecuosa	Abe
Fucosa	Fuc
Aminoazúcares	
Glucosamina	GlcN
Galactosamina	GalN
N-Acetilglucosamina	GlcNAc
N-Acetilgalactosamina	GalNAc
Ácido *N*-acetilneuramínico	NeuNAc
Ácido *N*-acetilmurámico	MurNAc
Azúcares ácidos	
Ácido glucorónico	GlcUA
Ácido idurónico	IdoA



Dihidroxiacetona fosfato

D-Gliceraldehído 3-fosfato

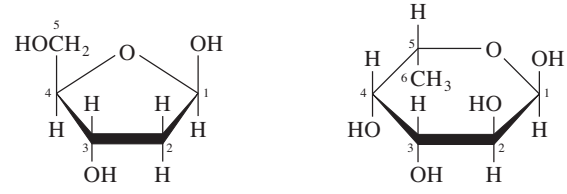
Figura 8.13 ▶
Estructuras de varios azúcares fosfatados importantes en el metabolismo.



α-D-Ribosa 5-fosfato

α-D-Glucosa 6-fosfato

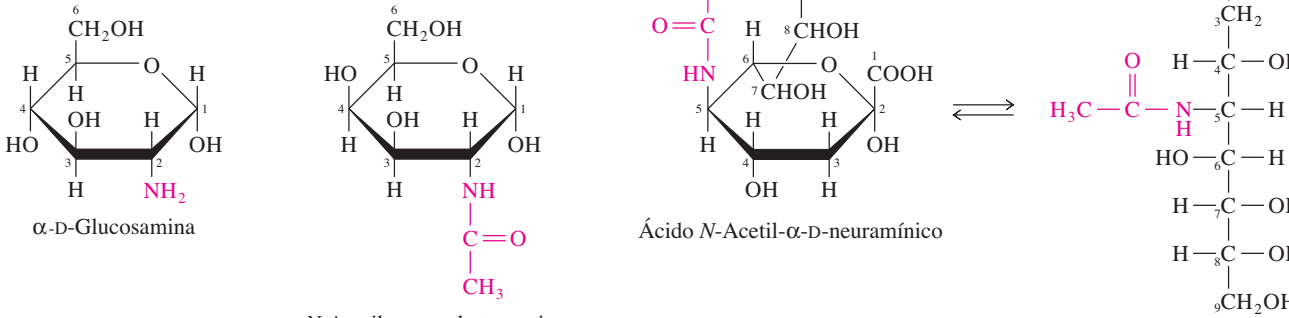
α-D-Glucosa 1-fosfato



β-2-Desoxi-D-ribosa

α-L-Fucosa (6-Desoxi-L-Galactosa)

Figura 8.14 ▶
Estructuras de los desoxiazúcares 2-desoxi D-ribosa y L-fucosa.



α-D-Glucosamina

N-Acetil-α-D-galactosamina

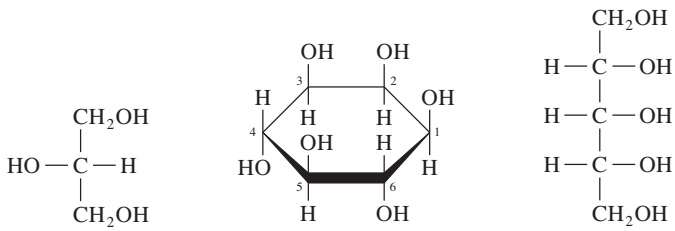
Ácido *N*-Acetil-α-D-neuramínico

Ácido *N*-Acetil-D-neuramínico (forma de cadena abierta)

Figura 8.15 ▲
Estructuras de varios aminoazúcares. Los grupos amino y acetilamino se muestran en gris oscuro.

D. Azúcares alcoholes

En un azúcar alcohol el oxígeno carbonílico del monosacárido precursor se ha reducido y se produce un polihidroxialcohol. La figura 8.16 muestra tres ejemplos de azúcares alcoholes. La glicerina y el *mio*-inositol son componentes importantes de los lípidos

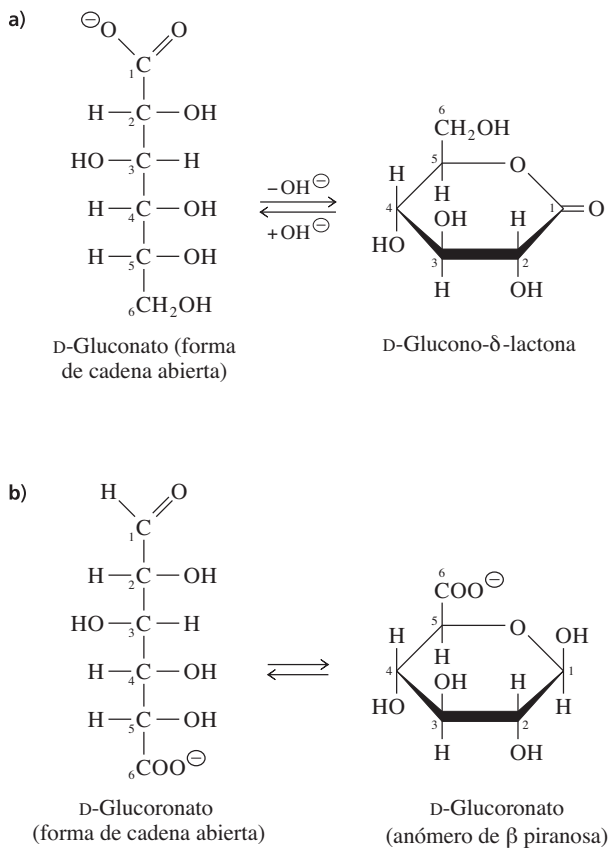


◀ Figura 8.16
Estructuras de varios azúcares alcoholes. La glicerina (una forma reducida del gliceraldehído) y el inositol (forma metabólicamente derivada de la glucosa) son componentes importantes de muchos lípidos. El ribitol (una forma reducida de la ribosa) es componente de la vitamina riboflavina y sus coenzimas.

(sección 10.4). El ribitol es un componente de flavina mononucleótido (FMN) y flavina adenina dinucleótido (FAD, sección 7.4). En general, los azúcares alcoholes reciben su nombre sustituyendo el sufijo *-osa* del monosacárido precursor por el de *-itol*.

E. Azúcares ácidos

Los azúcares ácidos son ácidos carboxílicos derivados de las aldosas, sea por oxidación de C-1 (el carbono aldehídico) para formar un ácido aldónico, o por oxidación del carbono con número mayor (el que tiene el alcohol primario) para formar un ácido aldurónico. En la figura 8.17 se ven las estructuras de los derivados aldónicos y aldurónicos de la glucosa, gluconato y glucoronato. Los ácidos aldónicos existen en la forma de cadena abierta, en solución alcalina, y forman lactonas (ésteres intramoleculares) al acidularlos. Los ácidos aldónicos pueden estar como piranosas, por lo que poseen un carbono anomérico. El ácido *N*-acetilneuramínico (figura 8.15) es un ácido aldónico y a la vez un aminoazúcar. Los azúcares ácidos son componentes importantes de muchos polisacáridos.



◀ Figura 8.17
Estructuras de azúcares ácidos derivados de la D-glucosa. **a)** Gluconato y su D-lactona. **b)** Las formas de cadena abierta y de piranosa para el glucuronato.

Véase una descripción del papel de la vitamina C en el recuadro 7.1.

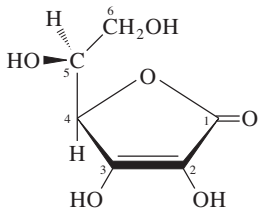


Figura 8.18 ▲
Ácido L-Ascórbico (vitamina C).

F. Ácido ascórbico

El ácido L-ascórbico (figura 8.18), o vitamina C, es un enodiol de una lactona derivada del D-glucoronato. Los primates no pueden convertir glucoronato en ácido ascórbico, y en consecuencia deben obtenerlo en su dieta. El ácido ascórbico es un cofactor esencial para las enzimas que catalizan la hidroxilación de los residuos de prolina y lisina durante la síntesis de colágena (sección 4.11).

8.5 Disacáridos y otros glicósidos

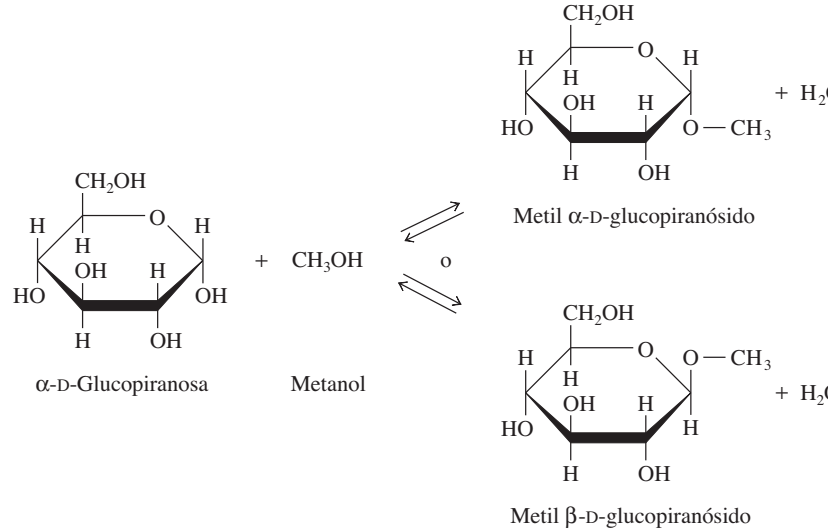
El **enlace glicosídico** es el principal enlace estructural en todos los polímeros de los monosacáridos. Es un enlace acetal, donde el carbono anomérico de un azúcar se condensa con un alcohol, una amina o un tiol. Por ejemplo, la glucopiranosa puede reaccionar con metanol en solución ácida, para formar un acetal (figura 8.19). Los compuestos que tienen enlaces glicosídicos se llaman glicósidos. Los **glucósidos** son una clase especial de glicósidos, donde la glucosa aporta el carbono anomérico. Entre los glicósidos hay disacáridos, polisacáridos y algunos derivados de carbohidrato.

A. Estructuras de los disacáridos

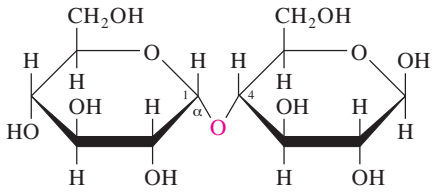
Los disacáridos se forman cuando el carbono anomérico de una molécula de azúcar interactúa con uno de varios grupos hidroxilo de la otra molécula de azúcar. Así, para los disacáridos y otros carbohidratos polímeros, se deben considerar los tipos de residuos de monosacárido que están presentes, y también los átomos que forman los enlaces glicosídicos. En la descripción sistemática de un disacárido, los átomos de enlace, se deben especificar la configuración del enlace glicosídico y el nombre de cada residuo de monosacárido (incluyendo su designación como piranosa o furanosa). La figura 8.20 presenta las estructuras y la nomenclatura de cuatro disacáridos comunes.

La maltosa (figura 8.20a) es un disacárido liberado durante la hidrólisis del almidón, que es un polímero de residuos de glucosa. Existe en la malta, una mezcla que se obtiene de maíz u otros granos, que se usa en la leche malteada y en la industria cervecera. La maltosa está formada por dos residuos de glucosa unidos por un enlace α-glicosídico. El enlace glicosídico une al C-1 de un residuo (a la izquierda de la figura 8.20a) con el átomo de oxígeno unido a C-4 del segundo residuo (a la derecha). La maltosa, en consecuencia, es α-D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucosa. El residuo de glucosa de la izquierda, cuyo carbono anomérico interviene en el enlace glicosídico, está

Figura 8.19 ▶
Reacción de glucopiranosa con metanol; produce un glucósido. En esta reacción de condensación catalizada por ácido, el grupo —OH anómero del hemiacetal se sustituye por un grupo —OCH_3 y se forma un metil glucósido, que es un acetal. El producto es una mezcla de los anómeros α y β del metil glucopiranósido.

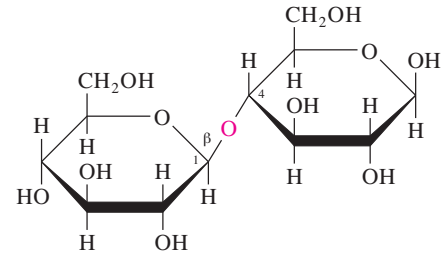


a)



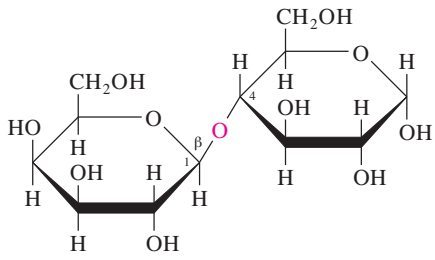
Anómero β de maltosa
(α-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-glucopiranosa)

b)



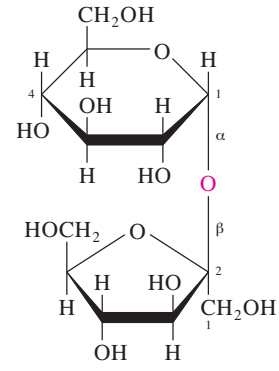
Anómero β de la celobiosa
(β-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-glucopiranosa)

c)



Anómero α de la lactosa
(β-D-galactopiranosil-(1→4)-α-D-glucopiranosa)

d)



Sacarosa
(α-D-glucopiranosil-(1→2)-β-D-fructofuranósido)

Figura 8.20 ▲
Estructuras de **a)** maltosa, **b)** celobiosa, **c)** lactosa y **d)** sacarosa. El átomo de oxígeno de cada enlace glicosídico se muestra en gris oscuro.

fijo en la configuración α, en tanto que el residuo de glucosa de la derecha (el extremo reductor, como se explica en la sección 8.5B) se equilibra libremente entre las estructuras α, β y de cadena abierta. La última está presente en cantidades muy pequeñas. La estructura de la figura 8.20a es el anómero β-piranosa de la maltosa (el anómero cuyo extremo hidroxilo libre en C-1 tiene la configuración β, la forma anómera predominante).

La celobiosa [β-D-glucopiranosil-(1 → 4)-D-glucosa] es otro dímero de la glucosa (figura 8.20b). La celobiosa es el disacárido repetitivo en la estructura de la celulosa, un polisacárido vegetal, y se libera durante la degradación de la celulosa. La única diferencia entre la celobiosa y la maltosa es que el enlace glicosídico en la celobiosa es β, y en la maltosa es α. El residuo de glucosa, en la derecha de la figura 8.20b, como el residuo de la derecha en la figura 8.20a, se equilibra entre las estructuras α, β y de cadena abierta. Se muestra el anómero β.

La lactosa [β-D-galactopiranosil-(1 → 4)-D-glucosa], carbohidrato principal en la leche, es un disacárido que sólo se sintetiza en las glándulas mamarias lactantes (figura 8.20c). Nótese que la lactosa es un epímero de la celobiosa. El anómero β de la lactosa, natural es más dulce y más soluble que el anómero β. El anómero β se puede encontrar en las nieves rancias, donde ha cristalizado durante el almacenamiento y ha dado una textura rasposa a la nieve.

La sacarosa [β-D-glucopiranosil-(1 → 2)-β-D-fructofuranósido] o azúcar de mesa es el disacárido más abundante en la naturaleza; sólo lo sintetizan las plantas (figura 8.20d). La sacarosa se distingue de los otros tres disacáridos de la figura 8.20 en que su enlace glicosídico une los átomos de carbono anoméricos de dos residuos de monosacárido. Por consiguiente, las configuraciones tanto de los residuos de glucopiranosa como

de fructofuranosa están fijas en la sacarosa, y ninguno de los residuos tiene libertad de equilibrarse entre sus anómeros α y β.

B. Azúcares reductores y no reductores

Como los monosacáridos y la mayor parte de los disacáridos son hemiacetales y en consecuencia contienen un grupo carbonilo reactivo, se oxidan con facilidad y forman productos diversos, propiedad que se usa con frecuencia para analizarlos. Esos carbohidratos, incluyendo glucosa, maltosa, celobiosa y lactosa, se llaman a veces azúcares reductores. Los azúcares reductores se detectaban por su capacidad de reducir iones metálicos, como Cu^{2+} o Ag^{+} y formar productos insolubles. Los carbohidratos que son acetales, como la sacarosa, no se oxidan con facilidad, porque ambos átomos de carbono anoméricos están fijos en un enlace glicosídico. Se clasifican como azúcares no reductores.

La capacidad reductora de un azúcar polímero tiene interés más que analítico. Las cadenas poliméricas de los oligosacáridos y polisacáridos tienen direccionalidad, con base en sus extremos reductores y no reductores. En un polímero lineal suele haber un extremo reductor (el residuo que contiene al carbono anomérico libre) y un extremo no reductor. Todos los enlaces glicosídicos internos de un polisacárido contienen acetales. Los residuos internos no están en equilibrio con las formas de cadena abierta, por lo que no pueden reducir iones metálicos. Un polisacárido ramificado tiene varios extremos no reductores, pero sólo un extremo reductor.

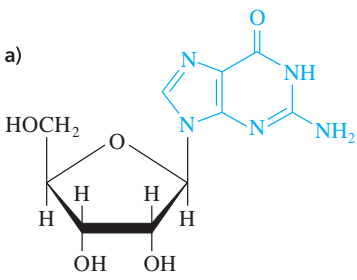
C. Nucleótidos y otros glicósidos

Los carbonos anoméricos de los azúcares forman enlaces glicosídicos no sólo con otros azúcares, sino también con diversos alcoholes, aminas y tioles. Los glicósidos que se encuentran con más frecuencia, además de los oligosacáridos y polisacáridos, son los nucleósidos, donde hay purina o pirimidina unida por su grupo amino secundario a una mitad de β-D-ribofuranosa o β-D-desoxirribofuranosa. Los nucleósidos se llaman *N*-glicósidos debido que en el enlace glicosídico particima un átomo de nitrógeno. La guanosina (β-D-ribofuranosilguanina) es un nucleósido típico (figura 8.21). Ya se ha descrito el ATP y otros nucleótidos que son coenzimas metabolito (sección 7.3); también el NAD y el FAD son nucleótidos.

En el capítulo 19 se presenta una descripción más completa de los nucleósidos y los nucleótidos.

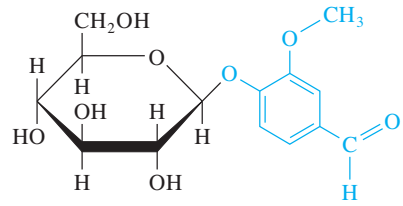
En la figura 8.21 se ven otros dos ejemplos de glicósidos naturales. El vainillin glucósido (figura 8.2b) es el compuesto saborizante del extracto de vainilla natural. Los β-galactósidos son otra clase abundante de glicósidos. En esos compuestos se unen varias moléculas de no azúcar en enlace β con la galactosa. Por ejemplo, los galactocerebrósidos, derivados del β-D-galactosilo 1-glicerol (figura 8.21c) son glicolípidos comunes en las membranas de células eucariotas, y se pueden hidrolizar con facilidad por acción de las enzimas llamadas β-galactosidasas.

a)



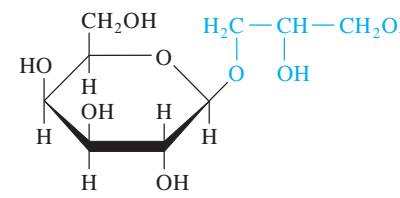
Guanosina

b)



Vainillina β-D-glucósido

c)



β-D-Galactosil 1-glicerol

Figura 8.21 ▲
Estructuras de tres glicósidos. Los componentes no azúcares se muestran en gris claro.
a) Guanosina. **b)** Vainillina glucósido, el compuesto saborizante del extracto de vainilla.
c) β-D-Galactosil-1-glicerol; sus derivados son frecuentes en las membranas celulares de eucariotas.

8.6 Polisacáridos

Con frecuencia se divide a los polisacáridos en dos clases extensas. Los **homoglicanos** (u homopolisacáridos) son polímeros que sólo contienen residuos de un tipo de monosacárido. Los **heteroglicanos** (o heteropolisacáridos) son polímeros que contienen residuos de más de un tipo de monosacárido. A diferencia de las proteínas, cuyas estructuras primarias se codifican por el genoma y tienen así longitudes específicas, los polisacáridos se forman sin una plantilla, por adición de determinados residuos de monosacárido y oligosacárido. El resultado es que las longitudes y las composiciones de las moléculas de polisacárido pueden variar dentro de una población. Algunos polisacáridos comunes, y sus estructuras, se presentan en la tabla 8.2.

La mayor parte de los polisacáridos también se pueden clasificar de acuerdo con sus funciones biológicas. Por ejemplo, el almidón y el glucógeno son polisacáridos de almacenamiento, y la celulosa y la quitina son polisacáridos estructurales. Se verán más ejemplos de la variedad y la versatilidad de los carbohidratos cuando se describan los heteroglicanos en glicoconjugados (sección 8.7).

A. Almidón y glucógeno

Todas las especies sintetizan D-glucosa. El exceso de glucosa se puede descomponer y producir energía metabólica. Los residuos de glucosa se almacenan como polisacáridos, hasta que se necesitan para producir energía. El homoglicano de almacenamiento más común de la glucosa en las plantas y los hongos es el almidón; y en los animales es el glucógeno. Ambos tipos de polisacárido existen en las bacterias.

En las células vegetales, el almidón existe como mezcla de amilosa y amilopectina, y se almacena en granos cuyos diámetros van de 3 a 100 μm. La amilosa es un polímero no ramificado de unos 100 a 1 000 residuos de D-glucosa unidos por enlaces glicosídicos α-(1 → 4), que se llaman específicamente enlaces glicosídicos α-(1 → 4), porque los carbonos anoméricos pertenecen a residuos de glucosa (figura 8.22a). El mismo tipo de unión conecta los monómeros de glucosa en el disacárido maltosa (figura 8.20a). Aunque no es verdaderamente soluble en agua, la amilosa forma micelas hidratadas en el agua, y puede adoptar una estructura helicoidal bajo ciertas condiciones (figura 8.22b).

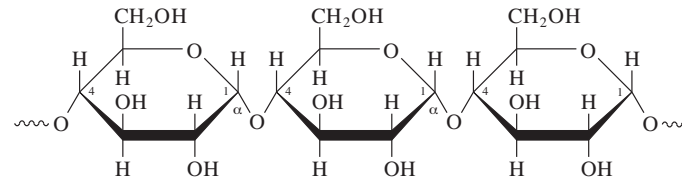
La amilopectina es una versión ramificada de la amilosa (figura 8.23). Las ramas, o cadenas laterales poliméricas, están unidas mediante enlaces glicosídicos α-(1 → 6) a las cadenas lineales de residuos, unidos por enlaces glicosídicos α-(1 → 4). La ramificación

TABLA 8.2 Estructuras de algunos polisacáridos comunes

Polisacárido[a]	Componente(s)[b]	Enlace(s)
Homoglicanos de almacenamiento		
Almidón		
Amilosa	Glc	α-(1 → 4)
Amilopectina	Glc	α-(1 → 4), α-(1 → 6) (ramas)
Glucógeno	Glc	α-(1 → 4), α-(1 → 6) (ramas)
Homoglicanos estructurales		
Celulosa	Glc	β(1 → 4)
Quitina	GlcNAc	β(1 → 4)
Heteroglicanos		
Glicosaminoglicanos	Disacáridos (aminoazúcares, azúcares ácidos)	Varios
Ácido hialurónico	GlcUA y GlcNAc	β(1 → 3), β(1 → 4)

[a]Los polisacáridos son no ramificados, a menos que se indique otra cosa.
[b]Glc = glucosa; GlcNAc = *N*-acetilglucosamina, GlcUA = D-glucuronato.

a)



b)

Figura 8.22 ▲
a) Estructuras de la amilosa. La amilosa es una forma de almidón, y es un polímero lineal de residuos de glucosa unidos por enlaces α-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glicosídicos. **b)** La amilosa puede tomar una conformación de hélice izquierda, que se hidrata en las superficies interior y exterior.

se presenta, en promedio, cada 25 residuos, y las cadenas laterales contienen unos 15 a 25 residuos de glucosa. Algunas de las mismas cadenas laterales están ramificadas. Las moléculas de amilopectina obtenidas de células vivas pueden contener 300 a 6 000 residuos de glucosa.

Un adulto humano consume unos 300 g de carbohidratos diariamente, gran parte de los cuales están en forma de almidón. Los granos crudos de almidón resisten la hidrólisis enzimática, pero la cocción los hace absorber agua e hincharse; el almidón hinchado es un sustrato de dos glicosidasas. El almidón en la dieta se degrada en el tracto gastrointestinal por las acciones de la α-amilasa y una enzima desramificadora. La α-amilasa, presente en animales y plantas, es una endoglicosidasa (actúa sobre enlaces glicosídicos

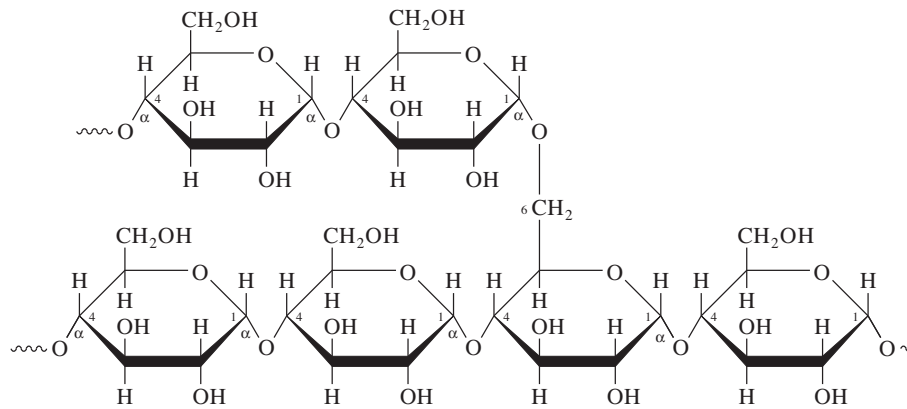


Figura 8.23 ▲
Estructura de la amilopectina. La amilopectina es una segunda forma de almidón; es un polímero ramificado. Los residuos lineales de glucosa en la cadena principal y las cadenas laterales de la amilopectina están unidas por enlaces glicosídicos α-(1 $\rightarrow$ 4)-D y las cadenas laterales están unidas a la cadena principal por enlaces α-(1 $\rightarrow$6)-D-glicosídicos.

internos). La enzima cataliza la hidrólisis aleatoria de los enlaces glicosídicos α-(1 $\rightarrow$ 4) de la amilosa y la amilopectina.

Otra hidrolasa, la β-amilasa, se encuentra en las semillas y los tubérculos de algunas plantas. La β-amilasa es una exoglicosidasa (actúa sobre los enlaces glicosídicos terminales). Cataliza la liberación hidrolítica secuencial de los extremos libres, no reductores, de la amilopectina.

No obstante sus designaciones con α y β, ambos tipos de amilasas sólo actúan sobre los enlaces α-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glicosídicos. La figura 8.24 muestra la acción de la α-amilasa y la α-amilasa sobre la amilopectina. Los enlaces α-(1 $\rightarrow$ 6) en los puntos de ramificación no son sustratos para la α- o la β-amilasa. Después de la hidrólisis de la amilopectina, catalizada por amilasa, permanecen núcleos muy ramificados resistentes a más hidrólisis, llamados **dextrinas límite**. Las dextrinas límite sólo se pueden seguir degradando después de que unas enzimas desramificadoras hayan catalizado la hidrólisis de los enlaces α-(1 $\rightarrow$ 6) en los puntos de ramificación.

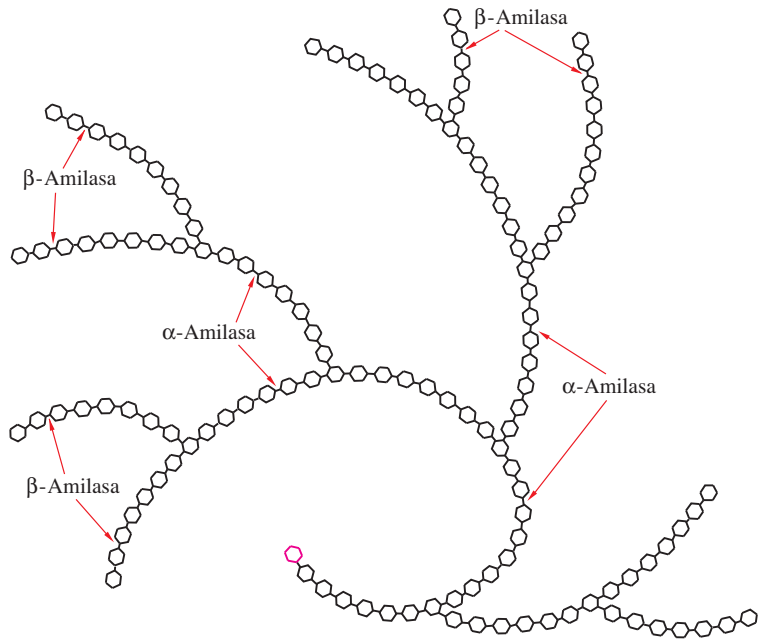
También el glucógeno es un polímero ramificado de residuos de glucosa. Contiene los mismos tipos de enlace de la amilopectina, pero en el glucógeno las ramas son más pequeñas y más frecuentes, y se presentan cada ocho a 12 residuos. En general, las moléculas de glucógeno son mayores que las de almidón, y contienen hasta unos 50 000 residuos de glucosa. En los mamíferos, de acuerdo con su estado de nutrición, el glucógeno puede formar hasta 10% de la masa del hígado, y 2% de la masa de los músculos.

Las estructuras ramificadas de la amilopectina y el glucógeno sólo poseen un extremo reductor, pero muchos extremos no reductores. Es en esos extremos no reductores donde se efectúa la prolongación y la degradación enzimáticas.

En el capítulo 12 se examinarán las enzimas que catalizan la síntesis y descomposición intracelular del glucógeno.

B. Celulosa y quitina

La celulosa es un polisacárido estructural. Es uno de los principales componentes de las paredes celulares rígidas que rodean muchas células vegetales. Los tallos y las ramas de muchas plantas están formados principalmente por celulosa. Este solo polisacárido forma un porcentaje apreciable de toda la materia orgánica en la Tierra. Igual que la amilosa, la celulosa es un polímero lineal de residuos de glucosa, pero en la celulosa esos residuos están unidos por enlaces β-(1 $\rightarrow$ 4) y no por enlaces α-(1 $\rightarrow$ 4). Los dos residuos de glucosa del disacárido celobiosa también están unidos por un enlace β-(1 $\rightarrow$ 4) (figura 8.20b). El tamaño de las moléculas de celulosa varía mucho, y va desde unos 300 hasta más de 15 000 residuos de glucosa.



◀ Figura 8.24
Acción de la α-amilasa y la β-amilasa sobre la amilopectina. La α-amilasa cataliza la hidrólisis aleatoria de los enlaces glucosídicos α-(1 $\rightarrow$ 4) internos; la β-amilasa actúa sobre los extremos no reductores. Cada hexágono representa un residuo de glucosa; el único extremo reductor del polímero ramificado se muestra en gris. (Una molécula real de amilopectina contiene mucho más residuos de glucosa que los que se ven aquí).

Los enlaces β de la celulosa dan como resultado una conformación extendida rígida, donde cada residuo de glucosa está girado 180° en relación con sus vecinos (figura 8.25). La extensa formación de puentes de hidrógeno dentro de, y entre las cadenas de celulosa, lleva a la formación de haces o fibrillas (figura 8.26). Las fibrillas de celulosa son insolubles en agua y son bastante fuertes y rígidas. Las fibras de algodón están formadas casi en su totalidad por celulosa, y la madera es la mitad, aproximadamente, de celulosa. Por su resistencia, la celulosa se usa en varias aplicaciones, y es un componente de varios materiales sintéticos, incluyendo celofán y telas de rayón.

Las enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces α-D-glicosídicos (α-glucosidasas como α- y β-amilasa) no catalizan la hidrólisis de los enlaces β-D-glicosídicos. De igual modo, las β-glicosidasas (como la celulasa) no catalizan la hidrólisis de los enlaces α-D-glicosídicos. Los humanos y otros mamíferos pueden metabolizar almidón, glucógeno, lactosa y sacarosa, y usar los productos monosacárido en diversas rutas metabólicas. No pueden metabolizar la celulosa, porque carecen de enzimas capaces de catalizar la hidrólisis de enlaces β-glicosídicos. Los rumiantes, como vacas y ovejas, tienen en su rumen (un compartimiento de sus estómagos con varias cámaras) microorganismos que producen β-glucosidasas. Así, los rumiantes pueden obtener glucosa del pasto y otras plantas ricas en celulosa. Como tienen bacterias productoras de celulasa en sus tractos digestivos, también las termitas pueden obtener glucosa de la celulosa en su dieta.

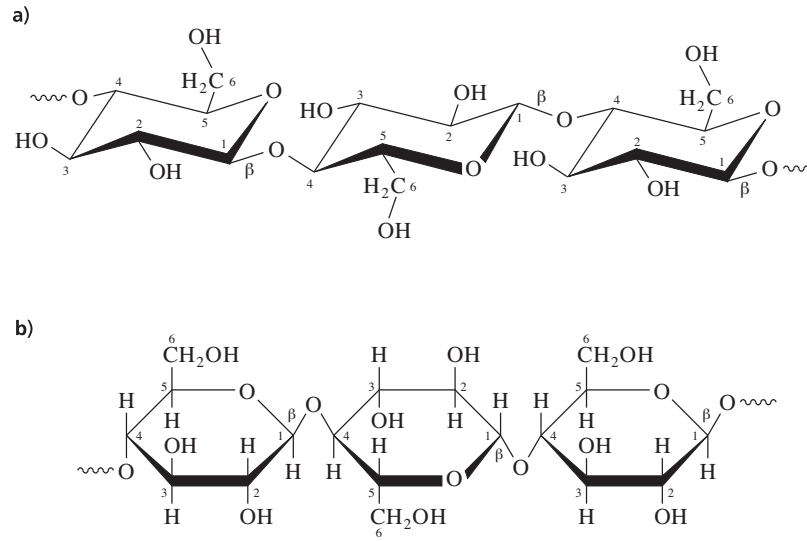
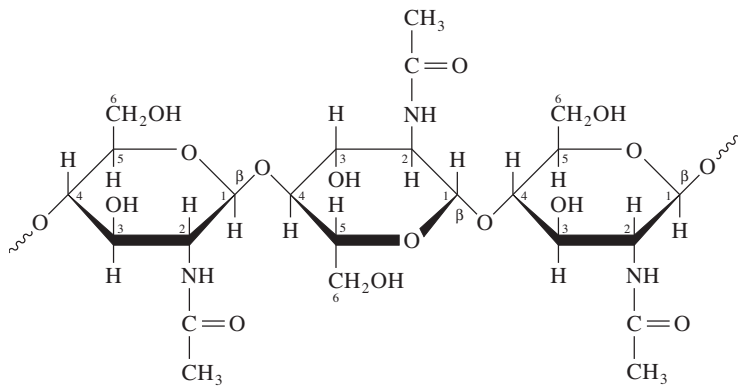


Figura 8.25 ▶
Estructura de la celulosa. Nótese la orientación alternada de los residuos sucesivos de glucosa en la cadena de celulosa. **a)** Conformación en silla. **b)** Proyección de Haworth modificada.

Figura 8.26 ▶
Fibrillas de celulosa. Los puentes de hidrógeno intracadenas e intercadenas dan su resistencia y rigidez a la celulosa.



◀ Figura 8.27
Estructura de la quitina. El homoglucano lineal quitina consiste en unidades repetitivas de residuos de GlcNAc enlazados por β-(1 $\rightarrow$ 4). Cada residuo está girado 180° respecto de sus vecinos.

La quitina, tal vez el segundo compuesto más abundante en la Tierra, es un homoglicano estructural que se encuentra en los exoesqueletos de los insectos y crustáceos, y también en las paredes celulares de la mayor parte de los hongos y en muchas algas. La quitina es un polímero lineal parecido a la celulosa. Está formado por residuos de GlcNAc unidos por β-(1 $\rightarrow$ 4), y no por residuos de glucosa (figura 8.27). Cada residuo de GlcNAc está girado 180° respecto de sus vecinos. Los residuos de GlcNAc en cadenas adyacentes de quitina forman puentes de hidrógeno entre sí, y el resultado son fibrillas lineales de gran resistencia. Con frecuencia, la quitina está estrechamente relacionada con compuestos no polisacáridos, como proteínas y material inorgánico.

8.7 Glicoconjugados

Los glicoconjugados consisten en polisacáridos unidos a (conjugados con) proteínas o péptidos. En muchos casos, los polisacáridos consisten en varias unidades distintas de monosacárido. Por consiguiente, son heteroglicanos. (Almidón, glucógeno, celulosa y quitina son homoglicanos). Los heteroglicanos aparecen en tres tipos de glicoconjugados: proteoglicanos, peptidoglicanos y glicoproteínas. En esta sección se verá cómo las propiedades químicas y físicas de los heteroglicanos en los glicoconjugados se adecuan a diversas funciones biológicas.

A. Proteoglicanos

Los **proteoglicanos** son complejos de proteínas y una clase de polisacáridos llamados glicosaminoglicanos. Esos glicoconjugados se presentan principalmente en la matriz extracelular (tejido conectivo) de animales multicelulares.

Los **glicosaminoglicanos** son heteroglicanos no ramificados de unidades repetitivas de disacárido. Como indica el nombre *glicosaminoglicano*, un componente del disacárido es un amino azúcar, ya sea D-galactosamina (GalN) o D-glucosamina (GlcN). El grupo amino del componente amino-azúcar puede acetilarse y formar *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) o GlcNAc, respectivamente. El otro componente del disacárido repetitivo suele ser un ácido aldurónico. Los grupos específicos hidroxilo y amino de muchos glicosaminoglicanos están sulfatados. Esos grupos sulfato y los grupos carboxilato de los ácidos aldurónicos hacen que los glicosaminoglicanos sean polianiónicos.

Se han aislado y caracterizado varios tipos de glicosaminoglicanos. Cada tipo tiene su propia composición de azúcar, enlaces, distribución y función en los tejidos, y cada uno está unido a una proteína característica. El ácido hialurónico es un ejemplo de glicosaminoglicano formado por la unidad repetitiva de disacárido que se ve en la figura 8.28 de la página siguiente. Se encuentra en el fluido de las articulaciones, donde forma una solución viscosa que es un lubricante excelente. El ácido hialurónico también es uno de los principales componentes de los cartílagos.

A la proteína de un proteoglicano pueden unirse hasta 100 cadenas de glicosaminoglicano. Estas cadenas de heteroglicano suelen estar unidas en forma covalente por

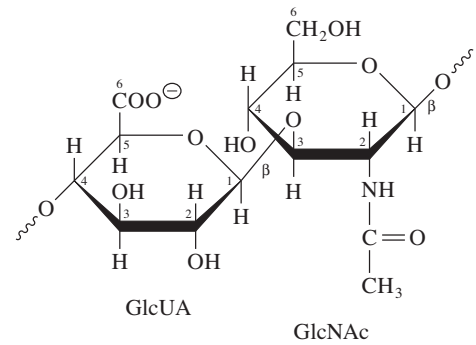


Figura 8.28 ▶
Estructura del disacárido repetitivo del ácido hialurónico. El disacárido repetitivo de este glicosaminoglucano contiene D-glucuronato (GlcUA) y GlcNAc. Cada residuo de GlcUA está unido a un residuo de GlcNAc mediante un enlace β-(1 → 3); cada residuo de GlcNAc a su vez está unido al siguiente residuo de GlcUA mediante un enlace β-(1 → 4).

un enlace glicosídico a los oxígenos de hidroxilo en residuos de serina. (No todos los glicosaminoglicanos están unidos en forma covalente a proteínas). Los glicosaminoglicanos pueden formar hasta 95% de la masa de un proteoglicano.

Los proteoglicanos están muy hidratados y ocupan un gran volumen porque su componente glicosaminoglicano contiene grupos polares y iónicos. Estas propiedades confieren elasticidad y resistencia a la compresión, que son propiedades importantes del tejido conectivo. Por ejemplo, la flexibilidad de un cartílago le permite absorber choques. Algo del agua puede ser exprimida cuando se comprime el cartílago, pero al aliviarse la presión el cartílago se puede rehidratar. Además de mantener las formas de los tejidos, los proteoglicanos también pueden actuar como cribas extracelulares, ayudando a dirigir el crecimiento y la migración celular.

El examen de la estructura del cartílago muestra cómo están organizados los proteoglicanos en ese tejido. El cartílago es una red de fibras de colágena (sección 4.11) dispersas en grandes agregados de proteoglicano ($M_r \sim 2 \times 10^8$). Cada agregado asume una forma característica que parece un cepillo para botellas (figura 8.29). Esos agregados contienen ácido hialurónico y diversos glicosaminoglicanos, y también dos tipos de proteínas: proteínas interiores o nucleares, y proteínas de enlace. Una hebra central de ácido hialurónico corre atravesando el agregado, y de sus lados se ramifican muchos proteoglicanos, proteínas interiores con cadenas de glicosaminoglicano unidas. Las proteínas interiores interactúan en forma no covalente con la hebra de ácido hialurónico, en su mayor parte con interacciones electrostáticas. Las proteínas de enlace estabilizan las interacciones entre proteína interior y ácido hialurónico.

El principal proteoglicano del cartílago se llama agrecan. El interior proteínico del agrecan ($M_r \sim 220\,000$) tiene unas 30 moléculas de sulfato de queratana (un glicosaminoglicano formado principalmente por residuos alternados de 6-sulfato de *N*-acetilglucosamina

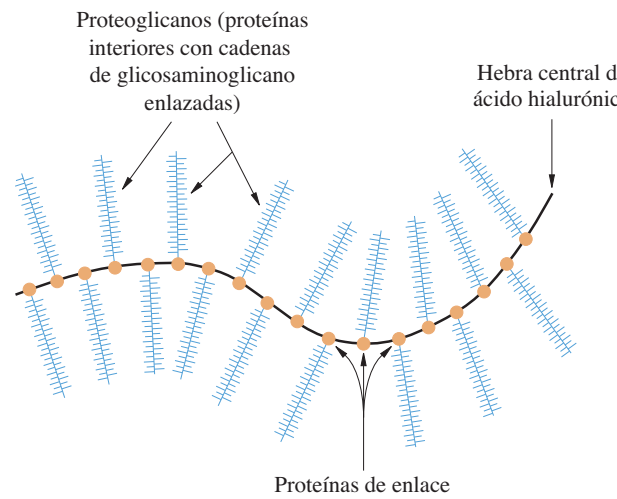
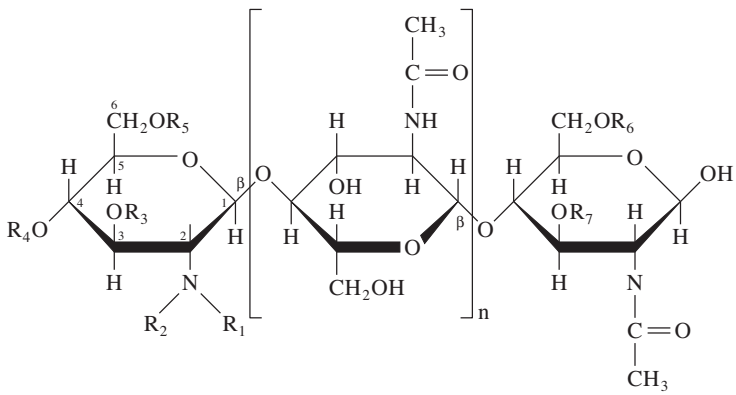


Figura 8.29 ▶
Agregado de proteoglicano de un cartílago. Las proteínas del interior que tienen cadenas de glicosaminoglicano se asocian a una hebra central de una sola molécula de ácido hialurónico. Esas proteínas tienen muchas cadenas de glicosaminoglicano unidas en forma covalente (moléculas de sulfato de queratano y de sulfato de condroitina). Las interacciones de las proteínas interiores con el ácido hialurónico se estabilizan por proteínas de enlace, que interactúan en forma no covalente con ambas clases de moléculas. El agregado parece cepillo para lavar botellas.

RECUADRO 8.1 Los factores de nodulación son lipo-oligosacáridos

Las leguminosas como alfalfa, frijol y soya desarrollan nódulos en sus raíces. Ciertas bacterias del terreno (rhizobia) infectan los nódulos, y en simbiosis con las plantas llevan a cabo fijación de nitrógeno (reducción de nitrógeno atmosférico a amoniaco). La simbiosis es muy específica: sólo pueden cooperar ciertas combinaciones de leguminosas y bacterias, y en consecuencia esos organismos se deben reconocer entre sí. Los rizobios producen moléculas extracelulares de señal, oligosacáridos llamados factores de nodulación. Las concentraciones extremadamente bajas de esos compuestos pueden inducir a las plantas anfitrión para que desarrollen los nódulos que puedan infectar a los rizobios. Una planta anfitrión sólo responde a un factor de nodulación que tenga composición característica.

Todos los factores de nodulación que se han estudiado hasta ahora son oligosacáridos que tienen una cadena lineal de β-(1 → 4)-*N*-acetilglucosamina (GlcNAc), la misma estructura repetitiva que en la quitina (sección 8.6b). Aunque puede variar la cantidad de residuos de tres a seis, la mayor parte de los factores de nodulación son pentámeros de azúcar (véase la figura abajo). La especificidad hacia la especie se obtiene por la variación en la cadena de polímero y la sustitución potencial en cinco sitios en el extremo no reductor (R1 a R5), y dos sitios en el extremo reductor (R6 y R7). R1 es un grupo acilo que sustituye el átomo de nitrógeno en C-2 del extremo no reductor, y también es un ácido graso, por lo general de 18 carbonos de longitud. Así, los factores de nodulación son lipo-oligosacáridos. El R6, unido al alcohol en C-6 del extremo reductor, puede tener diversas estructuras, incluyendo sulfato de furanosa o metil furanosa. La investigación de esos oligosacáridos, reguladores de crecimiento para leguminosas, ha estimulado la búsqueda de actividades biológicas de otros oligosacáridos.



◀ Estructura general de factores de nodulación, lipo-oligosacáridos con una columna vertebral de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc). La cantidad de residuos internos de *N*-acetilglucosamina se indica con *n*, que suele ser 3, pero que a veces es 1, 2 o 4. R1 es un sustituyente acilo graso, por lo general de 18 carbonos de longitud.

Véanse los detalles de la fijación de nitrógeno en la sección 17.1.

y de residuos de galactosa) y unas 100 moléculas de sulfato de condroitina (un glicosaminoglicano formado por residuos alternados de sulfato de *N*-acetilgalactosamina y de glucoronato). Agrecan es miembro de una pequeña familia de hialectanos, proteoglicanos que se unen al ácido hialurónico. Otros hialectanos dan elasticidad a las paredes de los vasos sanguíneos y modulan las interacciones entre células en el cerebro.

B. Peptidoglicanos

Los **peptidoglicanos** son polisacáridos unidos a péptidos pequeños. Las paredes celulares de muchas bacterias contienen una clase especial de peptidoglicano con un componente de heteroglicano unido a un péptido de cuatro o cinco residuos. El componente heteroglicano está formado por residuos alternados de GlcNAc y ácido *N*-acetilmurámico (MurNAc) unidos por enlaces β-(1 → 4) (figura 8.30, página siguiente). El MurNAc es un azúcar de nueve carbonos que sólo se encuentra en las bacterias. Consiste en el ácido D-lactato de tres carbonos unidos por un enlace éter a C-3 del GlcNAc. La mitad de polisacárido, en los peptidoglicanos, se parece a la quitina, excepto que cada segundo residuo de GlcNAc está modificado por adición de lactato para formar MurNAc. La acción antibacteriana de la lisozima (sección 6.6) se debe a su capacidad de catalizar la hidrólisis de las cadenas de polisacárido de los peptidoglicanos.

El componente peptídico de los peptidoglicanos varía entre las bacterias. En *Staphylococcus aureus* es un tetrapéptido con aminoácidos L y D alternados: L-Ala-D-Isoglu-L-Lys-D-Ala. (Isoglu representa isoglutamato, una forma de glutamato donde el

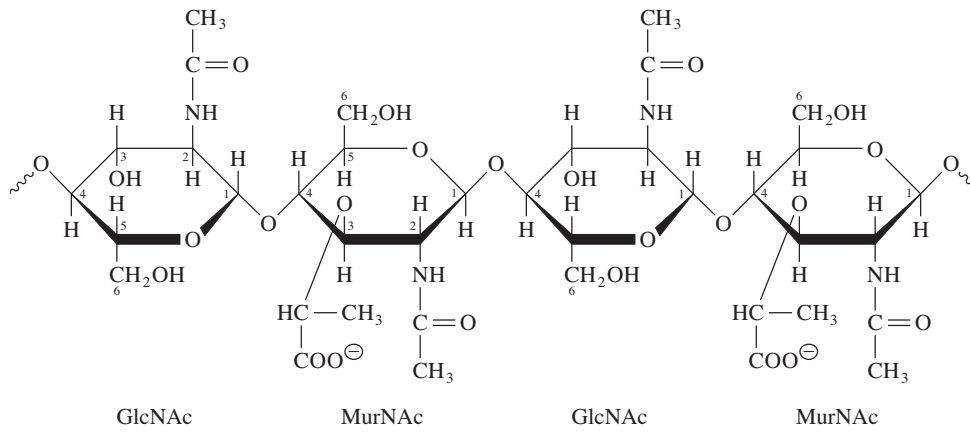


Figura 8.30 ▲
Estructura del polisacárido en el peptidoglicano de pared celular bacteriana. El glicano es un polímero de residuos alternados de GlcNAc y ácido *N*-acetilmurámico (MurNAc).

grupo γ-carboxilo (no el grupo α-carboxilo) está enlazado al siguiente residuo. Otras especies tienen un amionácido diferente en la tercera posición. Un enlace de amida une al grupo amino del residuo de L-alanina al grupo lactil carboxilato de un residuo de MurNAc del glucano polímero (figura 8.31). El tetrapéptido tiene enlaces cruzados con otro tetrapéptido en una molécula vecina de peptidoglicano, por una cadena de cinco residuos de glicina (pentaglicina). La pentaglicina une el residuo de L-lisina de un tetrapéptido al grupo carbonilo del residuo de D-alanina del otro tetrapéptido. En esencia, un extenso enlazamiento cruzado convierte al peptidoglicano en una macromolécula gigantesca y rígida que define la forma de la bacteria, cubriendo su membrana plasmática y protegiendo la célula contra fluctuaciones de la presión osmótica.

En las bacterias Gram-negativas hay una capa delgada de peptidoglicano entre la membrana plasmática interna y la membrana externa. En las bacterias Gram-positivas no hay membrana externa, y la pared celular de peptidoglicano es mucho más gruesa. En el procedimiento de tinción de Gram (por Hans Christian Gram), la gruesa pared de peptidoglicano de las bacterias Gram-positivas retiene un complejo colorante púrpura, pero no lo retiene la pared de peptidoglicano, más delgada, de las bacterias Gram-negativas.

Durante la biosíntesis del peptidoglicano se fija un péptido de cinco residuos (L-Ala-D-Isoglu-L-Lys-D-Ala-D-Ala) a un residuo de MurNAc. En los pasos siguientes se adicionan uno tras otro cinco residuos de glicina al grupo ε-amino del residuo de lisina, y se forma un puente de pentaglicina. En el paso final de la síntesis, una transpeptidasa cataliza la formación de un enlace peptídico entre el penúltimo residuo de alanina y un residuo terminal de glicina de un puente de pentaglicina en una hebra vecina de peptidoglicano. Esta reacción es impulsada por la liberación del residuo terminal de D-alanina. La estructura del antibiótico penicilina (figura 8.32) se parece a la de los residuos terminales D-Ala-D-Ala del peptidoglicano inmaduro. La penicilina se une, tal vez en forma irreversible, al sitio activo de la transpeptidasa e inhibe la actividad de la enzima, que así bloquea más síntesis de peptidoglicano. El antibiótico evita el crecimiento y la proliferación de las bacterias. La penicilina es tóxica para las bacterias, en forma selectiva, porque la reacción que afecta sólo sucede en ciertas bacterias y no en las células eucariotas.

C. Glicoproteínas

Las **glicoproteínas**, como los proteoglicanos, son proteínas que contienen oligosacáridos unidos en forma covalente (es decir, proteínas que están glicosiladas; los proteoglicanos son un tipo de glicoproteína). Las cadenas de carbohidrato de una glicoproteína varían de longitud, de 1 hasta más de 30 residuos, y pueden formar hasta 80% de la masa total de la molécula. Las glicoproteínas son un grupo extraordinariamente diverso

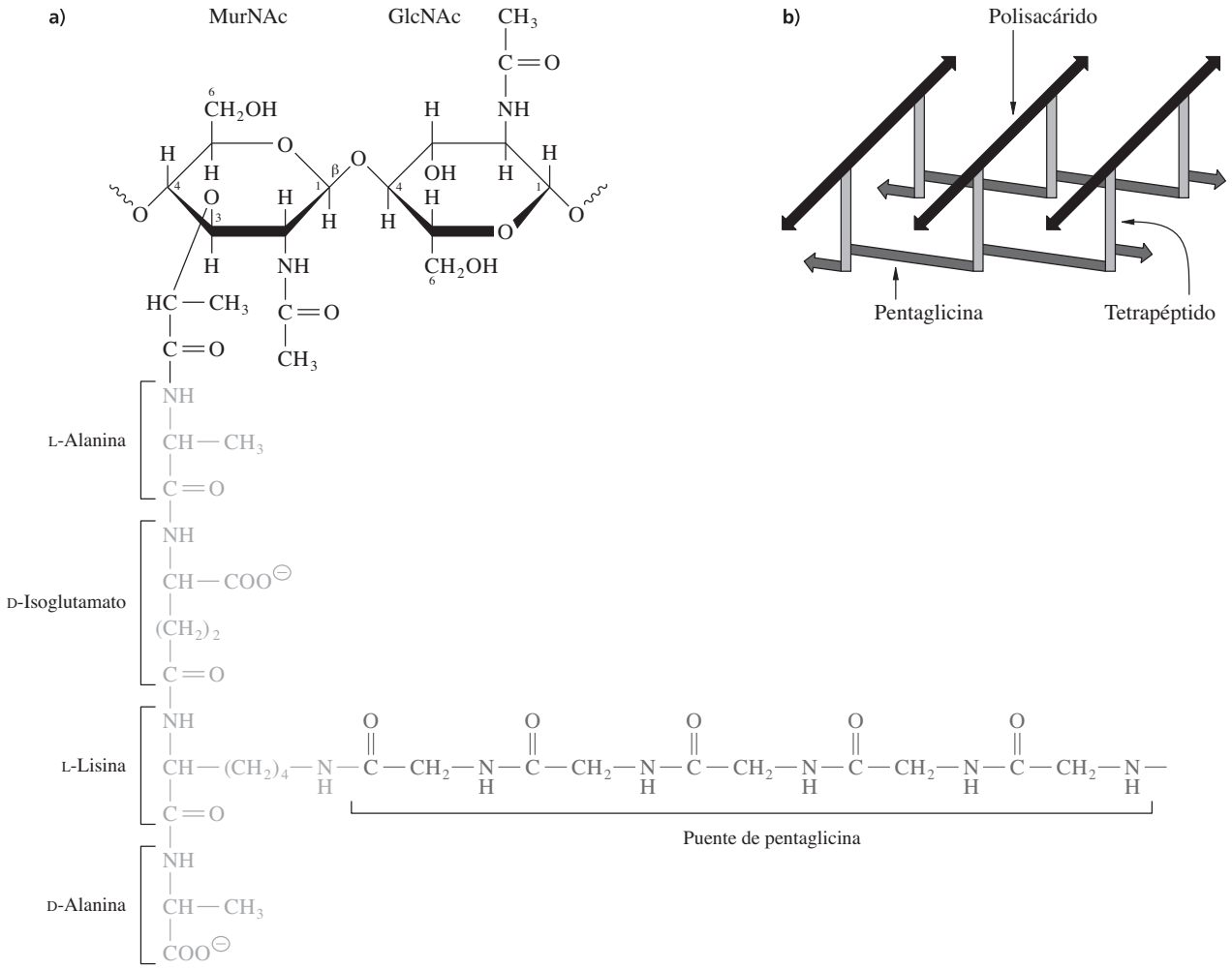


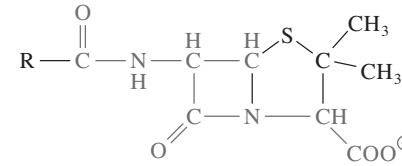
Figura 8.31 ▲
Estructura del peptidoglicano de *Staphylococcus aureus*. **a)** Unidad repetitiva de disacárido, componentes tetrapéptido y pentaglicina. El tetrapéptido (gris claro) está unido a un residuo MurNAc de la mitad de glucano (negro). El grupo ε-amino del residuo de L-lisina en un tetrapéptido tiene enlace cruzado con el grupo carboxilo α del residuo de D-alanina en otro tetrapéptido de una molécula vecina de peptidoglicano a través de un puente de pentaglicina (gris oscuro). **b)** Enlazamiento cruzado de la macromolécula de peptidoglicano.

de proteínas que abarca enzimas, hormonas, proteínas estructurales y proteínas de transporte.

Las cadenas de oligosacárido de las glicoproteínas muestran gran variabilidad de composición. La composición de esas cadenas puede variar, aun entre moléculas de la misma proteína, fenómeno que se llama microheterogeneidad.

Hay varios factores que contribuyen a la diversidad estructural de las cadenas de oligosacárido en las glicoproteínas.

1. Una cadena de oligosacárido puede contener varios azúcares diferentes. En las glicoproteínas eucariotas predominan ocho azúcares: las hexosas l-fucosa, d-galactosa, d-glucosa y d-manosa; las hexosaminas *N*-acetil-d-galactosamina y *N*-acetil-d-glucosamina; los ácidos siálicos de nueve carbonos (en general ácido *N*-acetilneuramínico), y la pentosa d-xilosa. Son posibles muchas combinaciones diferentes de estos azúcares.



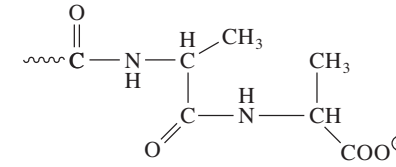


Figura 8.32 ▲
Estructuras de la penicilina y de D-Ala-D-Ala. La parte de la penicilina que se parece al dipéptido se muestra en gris oscuro. R pueden ser diversos sustituyentes.

2. Los azúcares pueden estar unidos por enlaces glicosídicos α o β.
3. También los enlaces pueden unir varios átomos de carbono en los azúcares. En las hexosas y hexosaminas, los enlaces glicosídicos siempre son C-1 de un azúcar, pero pueden ser C-2, C-3, C-4 o C-6 de otra hexosa, o C-3, C-4 o C-6 de un amino azúcar (C-2 suele estar N-acetilado en esta clase de azúcar). C-2 del ácido siálico, y no C-1, está enlazado a otros azúcares.
4. Las cadenas de oligosacáridos de las glicoproteínas pueden contener hasta cuatro ramas.

Sin embargo, la cantidad astronómica de estructuras posibles de oligosacáridos que permiten estos cuatro factores no se efectúa en las células, porque ellas no poseen glicosiltransferasas específicas que catalicen la formación de todos los enlaces glicosídicos posibles. Además, las glicoproteínas individuales, a través de sus conformaciones únicas, modulan sus propias interacciones con las enzimas glicosilantes, de modo que la mayor parte de las glicoproteínas tienen una estructura de oligosacáridos heterogénea, pero reproducible.

Las cadenas de oligosacáridos de la mayor parte de las glicoproteínas están enlazadas a través de *O* o de *N*. En los **oligosacáridos unidos por *O***, un residuo de GalNAc se enlaza, en forma típica, a la cadena lateral de un residuo de serina o de treonina. En los **oligosacáridos unidos por *N***, un residuo de GlcNAc está unido al nitrógeno de amida en un residuo de asparagina. Las estructuras de un enlace *O*-glicosídico y de uno *N*-glicosídico se comparan en la figura 8.33. Se pueden fijar residuos adicionales de azúcar al residuo de GalNAc o GlcNAc. Una glicoproteína individual puede contener oligosacáridos unidos en *O* y también en *N*. Algunas glicoproteínas contienen un tercer tipo de enlace. En ellas, la proteína está unida a etanolamina, que está enlazada a un oligosacárido ramificado al cual también está unido un lípido (sección 9.10).

Hay cuatro subclases importantes de enlaces *O*-glicosídicos en las glicoproteínas.

1. El enlace *O*-glicosídico más común es el de GalNAc-Ser/Thr mencionado antes. Hay otros azúcares, por ejemplo, galactosa y ácido siálico, que con frecuencia se unen al residuo de GalNAc (figura 8.34a).
2. Algunos de los residuos de 5-hidroxilisina (Hyl) de colágena (figura 4.37) se unen a la D-galactosa a través de un enlace *O*-glicosídico (figura 8.34b). Esta estructura es exclusiva de la colágena.
3. Los glicosaminoglicanos de ciertos proteoglicanos están unidos a la proteína interior mediante una estructura Gal-Gal-Xyl-Ser (figura 8.34c).
4. En algunas proteínas, un solo residuo de GlcNAc está enlazado a serina o treonina (figura 8.34d).

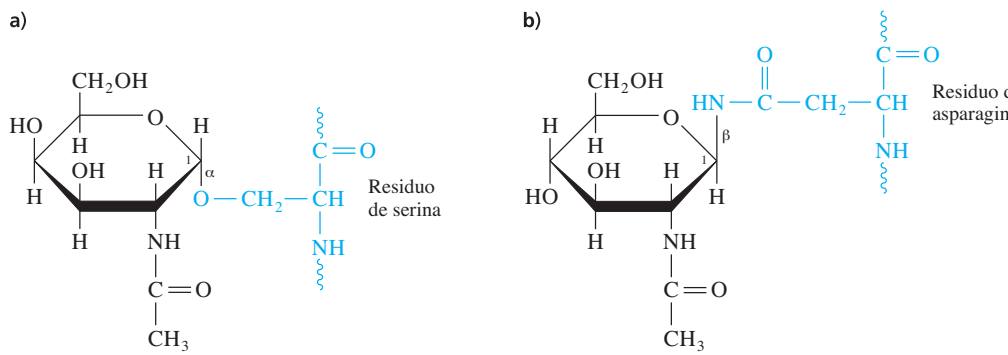
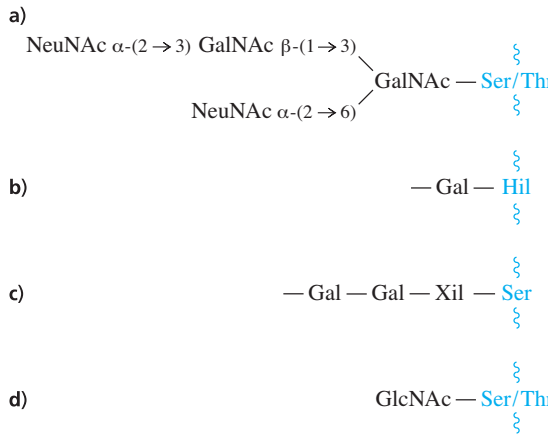


Figura 8.33 ▲
Enlaces *O*-glicosídicos y *N*-glicosídicos. **a)** Enlace de *N*-acetilgalactosamina-serina, principal enlace *O*-glicosídico de las glucoproteínas. **b)** Enlace de *N*-acetilglucosamina-asparagina, que caracteriza a las glicoproteínas enlazadas por *N*. El enlace *O*-glicosídico es α, en tanto que el enlace *N*-glicosídico es β.



◀ Figura 8.34
Cuatro subclases de enlaces *O*-glicosídicos. **a)** Ejemplo de un enlace típico donde la *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) con residuos agregados está unida a un residuo de serina o treonina. **b)** Enlace de colágena, donde un residuo de galactosa, por lo general unido a un residuo de glucosa, está enlazado a hidroxilisina (Hyl). **c)** Enlace de trisacárido en ciertos proteoglicanos. **d)** Enlace GlcNAc de algunas proteínas.

Los oligosacáridos enlazados por *O* pueden formar 80% de la masa de las mucinas. Esas glicoproteínas grandes se encuentran en el moco, líquido viscoso que protege y lubrica el epitelio de los tractos gastrointestinal, genitourinario y respiratorio. Las cadenas de oligosacárido de las mucinas contienen abundantes residuos de NeuNAc y de azúcares sulfatados. Las cargas negativas de estos residuos son, en parte, la causa de la forma extendida de las mucinas, lo que contribuye a la alta viscosidad de soluciones que contengan mucinas.

La biosíntesis de las cadenas de oligosacárido en las glicoproteínas requiere un conjunto de enzimas específicas en distintos compartimientos de la célula. En la síntesis escalonada de los oligosacáridos enlazados por *O*, las glicosiltransferasas catalizan la adición de grupos glicosilo donados por coenzimas nucleótido-azúcar. Las cadenas de oligosacárido se ensamblan por adición de la primera molécula de azúcar a la proteína, seguida por más adiciones de azúcar sencillo al extremo no reductor.

En la sección 22.10 se describirá la síntesis de glicoproteínas.

Los oligosacáridos enlazados por *N*, como los enlazados por *O*, son muy variados en secuencia y composición de azúcares. La mayor parte de los oligosacáridos unidos por *N* pueden dividirse en tres subclases: alta manosa, complejos e híbridos

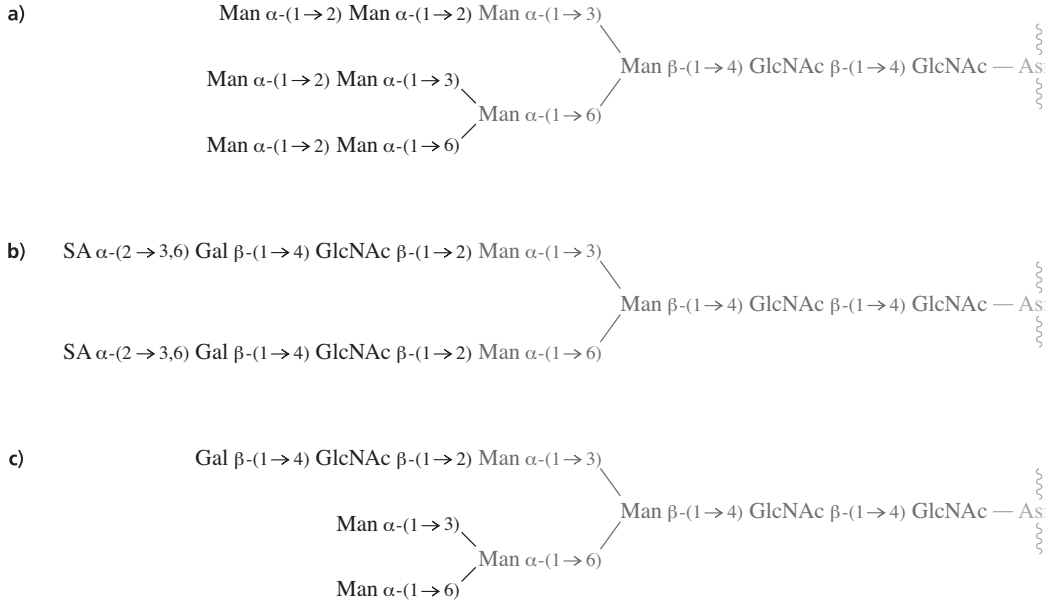


Figura 8.35 ▲
Estructuras de oligosacáridos *N*-enlazados. **a)** Cadena de alta manosa. **b)** Cadena compleja. **c)** Cadena híbrida. El interior de pentasacárido, común a todas las estructuras *N*-enlazadas se muestra en gris oscuro. SA representa ácido siálico, por lo general NeuNAc.

RECUADRO 8.2 El grupo sanguíneo ABO

El grupo sanguíneo ABO fue descubierto en 1901. La mayoría de los primates tienen tres clases distintas de oligosacáridos enlazados en *O* o en *N* en sus superficies celulares. La estructura interior de esos oligosacáridos se llama antígeno H. Consiste en varias combinaciones de galactosa (Gal), fucosa (Fuc), *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido *N*-acetilneuramínico (ácido siálico, NeuNAc). Estos monosacáridos están unidos de diversas maneras para formar una estructura con ramas cortas, que presenta mucha microheterogeneidad. Una de las estructuras más comunes de antígeno H se muestra en la siguiente figura.

La estructura interior (antígeno H) se puede modificar de varias maneras. La adición de un residuo de GalNAc en enlazamientos α-(1 $\rightarrow$ 3) forma el antígeno A. Esta reacción es catalizada por la enzima A. La adición de Gal en el enlace α-(1 $\rightarrow$ 3) es catalizada por la enzima B.

Si sólo hay antígeno A en una persona, tendrá sangre tipo A. Si sólo hay antígeno B, el tipo de sangre será B. El tipo de sangre AB indica que en las superficies celulares hay antígeno A y también antígeno B. Si no hay GalNAc ni Gal adicionadas a la estructura del antígeno H, no habrá antígeno A ni antígeno B y el tipo de sangre es O.

El grupo ABO de sangre es determinado por un solo gen en el cromosoma 9. La población humana (y de muchos otros primates) contiene muchos alelos de ese gen. El gen original codificaba la enzima A, que transfiere GalNAc. Las variantes de este gen han alterado la especificidad de la enzima, por lo que ya no reconoce a GalNAc, sino en su lugar transfiere Gal. Estas enzimas B difieren del alelo que codifica la enzima A en varios residuos de aminoácido. Se han determinado las estructuras de ambos tipos de enzimas de glucosiltransferasa y revelan que sólo se requiere una sustitución de aminoácido para cambiar la especificidad, de *N*-acetilaminogalactosiltransferasa, a galactosiltransferasa.

La estructura del cromosoma 9 también puede contener varios alelos que codifiquen proteínas no funcionales. Una de las mutaciones más comunes es una omisión de un solo par de bases, cerca del término N de la región codificante. Esta omisión desplaza el marco de lectura para traducción (sección 22.1) haciendo imposible sintetizar una enzima funcional de cualquiera de los tipos. Las personas homocigotas para esos alelos O no funcionales no sintetizan ni antígeno A ni antígeno B, y su tipo de sangre será O.

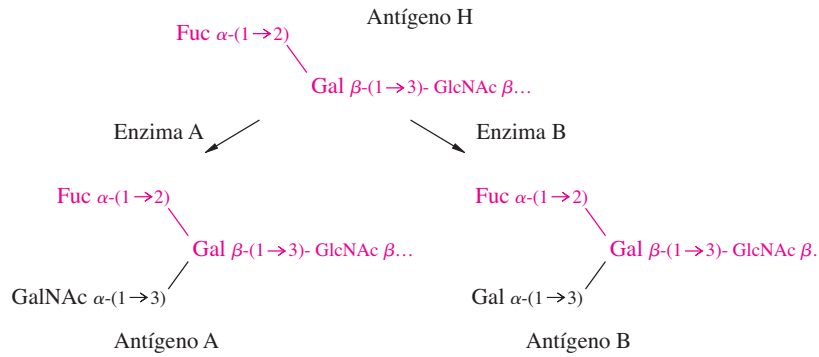
Todas las células contienen algo de oligosacárido nuclear (antígeno H), aun cuando el tipo de sangre sea A, B o AB. Eso se debe a que no se han modificado todas las estructuras de antígeno H. Bajo circunstancias normales, el plasma humano no tendrá anticuerpos contra el antígeno H. Sin embargo, los individuos con tipo O tendrán anticuerpos contra el antígeno A o el antígeno B, porque estas estructuras se reconocen como ajenas.

(figura 8.35). La apariencia de un pentasacárido nuclear común ($GlcNAc_2Man_3$) en cada clase refleja una ruta inicial común en su biosíntesis. La síntesis de oligosacáridos unidos por *N* comienza con el armado de un compuesto consistente en un oligosacárido ramificado con 14 residuos (nueve de los cuales son de manosa) unido al lípido dolicol. Toda la cadena de oligosacárido se transfiere a un residuo de asparagina en una proteína recién sintetizada, después de lo cual la cadena se acorta por la acción de glicosidasas. Las cadenas de alta manosa representan una etapa temprana en la biosíntesis de oligosacáridos unidos por *N*. Las cadenas complejas de oligosacárido son el resultado de más eliminación de residuos de azúcar de las cadenas de alta manosa, y de la adición de otros residuos de azúcar, como fucosa, galactosa, GlcNAc y ácido siálico (fenómeno llamado procesamiento de oligosacárido). Como en la síntesis de oligosacáridos unidos por *O,* esos residuos adicionales de azúcar son donados por los nucleótido azúcares, en reacciones catalizadas por glicosiltransferasas. En ciertos casos, una glicoproteína puede contener una cadena de oligosacárido híbrido, un oligosacárido ramificado donde una rama es del tipo de alta manosa, y la otra es del tipo complejo.

La mayor parte de las glicoproteínas se secretan de la célula o se unen a la superficie externa de la membrana plasmática. Hay muy pocas glicoproteínas en el citoplasma; con raras excepciones, ninguna de las enzimas metabólicas básicas está glicosilada. La adición de cadenas de oligosacárido se acopla estrechamente a proteínas específicas en la luz del retículo endoplásmico, y los grupos se modifican debido a varias enzimas de glicosiltransferasa, cuando las proteínas pasan del retículo endoplásmico a través del aparato de Golgi y a la superficie celular. La estructura del oligosacárido enlazado sirve como marcador para clasificar las proteínas en varios compartimientos. Por ejemplo, algunas proteínas deben ir a los lisosomas, dependiendo de la estructura del oligosacárido, en tanto que otras deben secretarse.

Si los individuos tipo O reciben una transfusión sanguínea de alguien con sangre tipo A, B o AB, desarrollarán una respuesta inmune y rechazarán esa sangre. De igual modo, si se tiene sangre tipo A, tendrá anticuerpos tipo B y no se podrá recibir una transfusión de alguien que tenga sangre tipo B o AB.

El alelo O (enzima no funcional) es el más común en las poblaciones humanas, y el alelo B es el más raro. Algunas poblaciones estadounidenses nativas son homogéneas para el alelo O, y todos, en ellas, tienen sangre tipo O. Los individuos tipo O son perfectamente normales, lo que indica que la ausencia de estructuras de oligosacáridos A y B no tiene efecto sobre el crecimiento y desarrollo normales. Sin embargo, hay ciertas correlaciones entre el tipo de sangre y las enfermedades. Por ejemplo, las personas con sangre tipo O son más susceptibles al cólera debido a infecciones de la bacteria *Vibrio cholerae*. Esas presiones de selección podrían ser responsables de mantener las frecuencias de alelos A y B en algunas poblaciones.



Además de sus funciones como marcadores en clasificación y secreción, la presencia de una o más cadenas de oligosacáridos puede alterar sus propiedades físicas, como su tamaño, forma, solubilidad, carga eléctrica y estabilidad. Las propiedades biológicas que pueden alterarse comprenden rapidez de secreción, rapidez de plegado e inmunogenia. En pocos casos se han identificado los papeles específicos de las cadenas de oligosacárido en las glicoproteínas. Por ejemplo, varias hormonas de mamíferos son glicoproteínas díméras cuyas cadenas de oligosacáridos facilitan el ensamble del dímero y confieren resistencia contra la proteólisis. También, el reconocimiento de una célula por parte de otra durante la migración celular, o durante la fertilización del oocito, puede depender en parte de la unión de proteínas en la superficie de una célula con las porciones de carbohidrato de ciertas glicoproteínas en la superficie de la otra célula.

Resumen

1. Los carbohidratos comprenden monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Los monosacáridos se dividen en aldosas o cetosas, o sus derivados.
2. Un monosacárido se especifica por D o L, según la configuración del átomo quiral más alejado del átomo de carbono carbonílico. Cada monosacárido tiene 2^n estereoisómeros posibles, donde n es la cantidad de átomos de carbono quiral. Los enantiómeros son imágenes especulares que no se pueden sobreponer una con otra. Los epímeros difieren de configuración sólo en uno de los centros quirales.
3. Las aldosas con al menos cinco átomos de carbono, y las cetosas con al menos seis átomos de carbono, existen principalmente en forma de hemiacetales o hemicetales cíclicos, llamados furanosas y piranosas. En estas estructuras anulares, la configuración del carbono anomérico (carbonílico) se indica con α o β. Las furanosas y las piranosas pueden adoptar varias conformaciones.
4. Entre los derivados de los monosacáridos están los fosfatos de azúcar, desoxi azúcares, aminoazúcares, azúcares alcoholes y azúcares ácidos.

5. Se forman glicósidos cuando el carbono anomérico de un azúcar forma un enlace glicosídico con otra molécula. Entre los glicósidos están los disacáridos, polisacáridos y algunos derivados de carbohidratos.

6. Los homoglicanos son polímeros que contienen un solo tipo de residuo de azúcar. Como ejemplos de los homoglicanos están los polisacáridos de almacenamiento almidón y glucógeno, y los polisacáridos estructurales celulosa y quitina.

7. Los heteroglicanos, que contienen más de un tipo de residuo de azúcar, se encuentran en glicoconjugados, que comprenden proteoglicanos, peptidoglicanos y glicoproteínas.

8. Los proteoglicanos son proteínas unidas a glicosaminoglicanos; éstos a su vez son cadenas de disacáridos repetitivos. Los proteoglicanos son prominentes en la matriz extracelular y en tejidos conectivos, como los de los cartílagos.

9. Las paredes celulares de muchas bacterias están hechas de peptidoglicanos, que son cadenas de heteroglicano unidas a péptidos. Las moléculas de peptidoglicano tienen muchos enlaces cruzados, que en esencia los convierten en una macromolécula rígida que define la forma de una bacteria y protege a la membrana plasmática.

10. Las glicoproteínas son proteínas que contienen oligosacáridos unidos por enlaces covalentes. Las cadenas de oligosacárido de la mayor parte de las glicoproteínas están unidas por *O* a residuos de serina o treonina, o están unidas por *N* a residuos de asparagina, y tienen gran variedad de estructuras y composición de azúcares.

Problemas

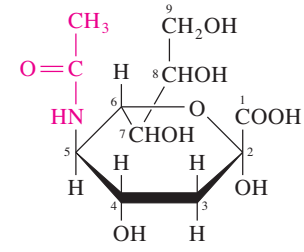
1. Identifique cada uno de los siguientes:
- a) Dos aldosas cuya configuración en los carbonos 3, 4 y 5 coincida con la D-fructosa.
- b) El enantiómero de la D-galactosa.
- c) Un epímero de la D-galactosa que también sea epímero de la D-manosa.
- d) Una cetosa que no tenga centros quirales.
- e) Una cetosa que sólo tenga un centro quiral.
- f) Residuos de monosacárido de celulosa, amilosa y glucógeno.
- g) Residuos monosacáridos de quitina.

2. Trace proyecciones de Fischer para: a) L-manosa, b) L-fucosa (6-desoxi-L-galactosa), c) D-xilitol y d) D-iduronato.

3. Describa las propiedades estructurales generales de los glicosaminoglicanos.

4. La miel es una emulsión de D-fructosa microcristalina y D-glucosa. Aunque la D-fructosa en polisacáridos existe principalmente en la forma de furanosa, la D-fructosa en solución o cristalina (como en la miel) es una mezcla de varias formas, donde predomina la β-D-fructopiranosa (67%) y la β-D-fructofuranosa (25%). Trace la proyección de Fischer para la D-fructosa e indique cómo puede ciclarse y formar los dos ciclos anteriores.

5. El ácido siálico (ácido *N*-Acetil-α-D-neuramínico) se encuentra con frecuencia en oligosacáridos *N*-enlazados, que intervienen en interacciones entre células. Las células cancerosas sintetizan cantidades mucho mayores de ácido siálico que las células normales, y se han propuesto derivados del ácido siálico como agentes anticancerosos para bloquear las interacciones en superficies celulares de las células normales y cancerosas. Conteste lo siguiente, acerca de la estructura del ácido siálico:
- a) ¿Es una forma anomérica α o β?
- b) ¿Tendrá el ácido siálico mutarrotación entre las formas anoméricas α y β?
- c) ¿Es un "desoxi" azúcar?
- d) ¿Formará la cadena abierta del ácido siálico un aldehído o una cetona?
- e) ¿Cuántos carbonos quirales hay en el anillo de azúcar?



Ácido siálico

6. ¿Cuántos estereoisómeros son posibles para la glucopiranosa y la fructofuranosa? ¿Cuántos son azúcares D en cada caso, y cuántos son azúcares L?

7. Trace la estructura de cada una de las moléculas siguientes, e indique con un asterisco los carbonos quirales.
- a) Fosfato de α-D-glucosa.
- b) 5-Fosfato de 2-desoxi-β-D-ribosa.
- c) 3-Fosfato de D-gliceraldehído.
- d) L-Glucuronato.

8. En solución acuosa, casi todas las moléculas de D-glucosa (>99%) tienen la forma de piranosa. Otras aldosas tienen mayor proporción de moléculas en la forma de cadena abierta. Puede ser que la D-glucosa haya evolucionado hasta ser el combustible metabólico predominante, porque es menos probable que sus isómeros reaccionen con las proteínas celulares y las dañen. Explique por qué la D-glucosa reacciona menos que otras aldosas con los grupos amino de las proteínas.

9. ¿Por qué la forma β-d-glucopiranosa de la glucosa es más abundante que la α-d-glucopiranosa en solución acuosa?

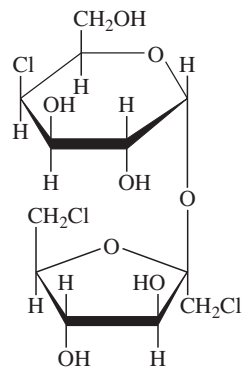
10. Las orientaciones relativas de los sustituyentes en los anillos de ribosa se determinan por la conformación del anillo mismo, y si la ribosa es parte de una molécula polimérica, entonces la conformación del anillo afectará a la estructura total del polímero. Por ejemplo, la orientación de los sustituyentes de fosfato de ribosa, que unen a las unidades monoméricas de nucleósido, es importante para determinar la estructura general de las moléculas de ácido nucleico. En una de las formas principales del ADN (B-ADN), los anillos de ribofuranosa adoptan una conformación de sobre, donde el carbono C-2′ está arriba del plano definido por C-1, C-3, C-4 y el oxígeno del anillo (conformación C-2′ *endo*). Dibuje la estructura de sobre del 5-fosfato de D-ribosa, con una base nucleósido (B) unida en posición β-anomérica al carbono C-1.

11. En un procedimiento para analizar la glucosa hemática se pone una gota de sangre sobre una tira de papel impregnada con la enzima glucosa oxidasa, y todos los reactivos que se necesitan en la reacción

$$\beta\text{-D-Glucosa} + O_2 \longrightarrow \text{D-Gluconolactona} + H_2O_2$$

El H_2O_2 producido causa un cambio de color en el papel, que indica cuánta glucosa está presente. Ya que la glucosa oxidasa es específica para el anómero β de la glucosa ¿por qué puede medirse la glucosa total en la sangre?

12. La sucralosa (registrada con el nombre comercial Splenda®) es un edulcorante no nutritivo (no calórico), aproximadamente 600 veces más dulce que el azúcar. Como la sucralosa es estable al calor, se puede usar en cocina y repostería. La estructura de la sucralosa se ve a continuación. Indique el nombre del disacárido que se usa como sustrato de partida en la síntesis de la sucralosa. ¿Qué modificaciones químicas se han hecho al disacárido de partida?



13. Trace proyecciones de Haworth para los siguientes glicósidos:

a) Isomaltosa [α-D-glucopiranosilo-(1 $\rightarrow$ 6)-α-D-glucopiranosa].

b) Amigdalina, compuesto que hay en los huesos de ciertas frutas y tiene un grupo —$CH(CN)C_6H_5$ unido a C-1 de β-D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)-β-D-glucopiranosa.

c) El oligosacárido unido a *O* en la colágena (β-D-galactosa unida al residuo 5-hidroxilisina).

14. El sulfato de queratano es un glicosaminoglicano formado principalmente por la siguiente unidad repetitiva de disacárido: —Gal β(1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc6S β(1- >3)—.

El azúcar acetilado tiene un éster de sulfato en C-6. El sulfato de queratano se encuentra en la córnea, los huesos y los cartílagos, agregado a otros glicosaminoglicanos, como sulfato de condroitina. Trace una proyección de Haworth de la unidad repetitiva de disacárido contenida en el sulfato de queratano.

15. Varias enfermedades son consecuencia de deficiencias hereditarias en glicosidasas específicas. En esas enfermedades se degradan ciertas glicoproteínas en forma incompleta, y en los tejidos se acumulan oligosacáridos. ¿Cuáles de los oligosacáridos *N*-enlazados de la figura 8.35 se afectarían por deficiencias de las enzimas siguientes?

a) *N*-Acetil-β-glucosaminil asparagina amidasa

b) β-Galactosidasa

c) Sialidasa

d) Fucosidasa

16. Se ha sintetizado un polímero de carbohidrato-aminoácido que es potente inhibidor del virus de la influenza. Se cree que el virus se inactiva cuando se unen múltiples grupos sialilo a las proteínas de la superficie viral. Dibuje la estructura química de la parte de carbohidrato de este polímero (abajo, donde X representa al resto del polímero).

NeuNAc α-(2 $\rightarrow$ 3) Gal β-(1 $\rightarrow$ 4) Glu β-(1 $\rightarrow$)-X

Lecturas seleccionadas

Generalidades

Collins, P. M. Ed. (1987). *Carbohydrates* (London and New York: Chapman and Hall).

El Khadem, H. S. (1988). *Carbohydrate Chemistry: Monosaccharides and Their Derivatives* (Orlando, FL: Academic Press).

Factores de nodulación

Dénarié, J. y Debellé, F. (1996). Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem*. 65:503-535.

Mergaert, P., Van Montagu, M. y Holsters, M. (1997). Molecular mechanisms of Nod factor diversity. *Mol. Microbiol*. 25:811-817.

Proteoglicanos

Heinegård, D. y Oldberg, Å. (1989). Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB J.* 3:2042-2051.

Iozzo, R. V. (1999). The biology of the small leucine-rich proteoglycans: functional network of interactive proteins. *J. Biol. Chem*. 274: 18843-18846. Describe las funciones de la decorina y otros SLRP.

Iozzo, R. V. y Murdoch, A. D. (1996). Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J.* 10:598-614. Descripción de proteoglicanos y hialectanos pequeños, ricos en leucina.

Kjellén, L. y Lindahl, U. (1991). Proteoglycans: structures and interactions. *Annu. Rev. Biochem*. 60:443-475.

Glicoproteínas

Drickamer, K. y Taylor, M. E. (1998). Evolving views of protein glycosylation. *Trends Biochem. Sci.* 23:321-324. Especulación acerca de la evolución de las rutas de glicosilación.

Dwek, R. A., Edge, C. J., Harvey, D. J., Wormald, M. R. y Parekh, R. B. (1993). Analysis of glycoprotein-associated oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* 62:65-100.

Lechner, J. y Wieland, F. (1989). Structure and biosynthesis of prokaryotic glycoproteins. *Annu. Rev. Biochem.* 58:173-194.

Marionneau, S., Caileau-Thomas A., Rocher, J., Le Moullac-Vaidye, B. Ruvoën, N. Clément, M. y Le Pendu, J. (2001). ABH and Lewis histo-blood-antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie* 83:565-573.

Patenaude, S. I., Seto, N. O. L., Borisova, S. N., Szpacenko, A., Marcus, S. L., Palcic, M. M. y Evans, S. V. (2002). The structural basis for specificity in human ABO(H) blood group biosynthesis. *Nat. Struct. Biol*. 9:685-690.

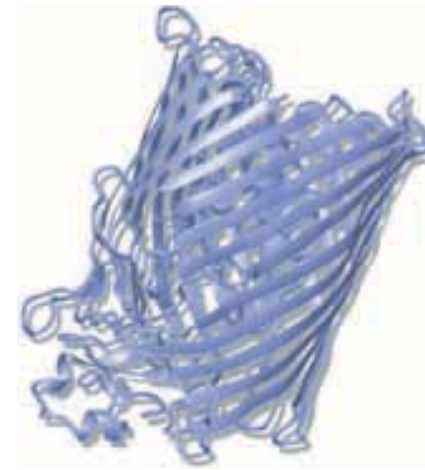
Rademacher, T. W., Parekh, R. B. y Dwek, R. A. (1988). Glycobiology. *Annu. Rev. Biochem*. 57:785-838. Repaso de los oligosacáridos unidos a proteínas y lípidos, incluyendo cambios de glicosilación, en varias enfermedades.

Rudd, P. M. y Dwek, R. A. (1997). Glycosylation: heterogeneity and the 3D structure of proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 32:1-100. Explicación de la poca heterogeneidad de las glicoproteínas.

Strous, G. J. y Dekker, J. (1992). Mucin-type glycoproteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 27:57-92.

9

capítulo nueve



Lípidos y membranas

En este capítulo se examinarán los **lípidos** (de *lipo-,* grasa), una tercera gran clase de macromoléculas. Como las proteínas y los carbohidratos, los lípidos son componentes esenciales de todos los organismos vivos. Sin embargo, a diferencia de las proteínas y los carbohidratos, los lípidos tienen estructuras muy variadas. A menudo se definen como compuestos orgánicos insolubles en agua (o sólo poco solubles), que se encuentran en los sistemas biológicos. Los lípidos tienen gran solubilidad en solventes orgánicos no polares. Son hidrofóbicos (no polares) o bien son anfipáticos (contienen regiones polares y no polares al mismo tiempo). Se comenzará con una descripción de las estructuras y funciones de las diversas clases de lípidos. En la segunda parte se estudiarán las estructuras y las funciones de las membranas biológicas, cuyas propiedades como barreras celulares frente a solutos polares dependen de las propiedades de sus lípidos.

9.1 Diversidad estructural y funcional de los lípidos

En la figura 9.1 se muestran las clases principales de lípidos y sus interrelaciones estructurales. Los lípidos más simples son los **ácidos grasos**, y tienen la fórmula general R—COOH, donde R representa una cadena de hidrocarburo. Los ácidos grasos son componentes de muchos tipos más complejos de lípidos, incluyendo los triglicéridos o triacilgliceroles, los glicerofosfolípidos y los esfingolípidos. Los lípidos que contienen grupos fosfato se llaman **fosfolípidos** y los que tienen grupos esfingosina y carbohidrato a la vez se llaman **glicoesfingolípidos**. Los esteroides, las vitaminas lipídicas y los terpenos se relacionan con la molécula de isopreno, de cinco carbonos, y por consiguiente se llaman **isoprenoides**. El nombre *terpenos* se ha aplicado a todos los isoprenoides, pero en general se restringe a los que existen en las plantas.

Los lípidos tienen funciones biológicas diversas, al igual que estructuras diversas. Las membranas biológicas contienen una variedad de lípidos anfipáticos, incluyendo los glicerofosfolípidos y los esfingolípidos. En algunos organismos, la función de los

Arriba: Estructura de cinta para la porción transmembranal de porina FhuA de *Escherichia coli* (véase la figura 9.28).

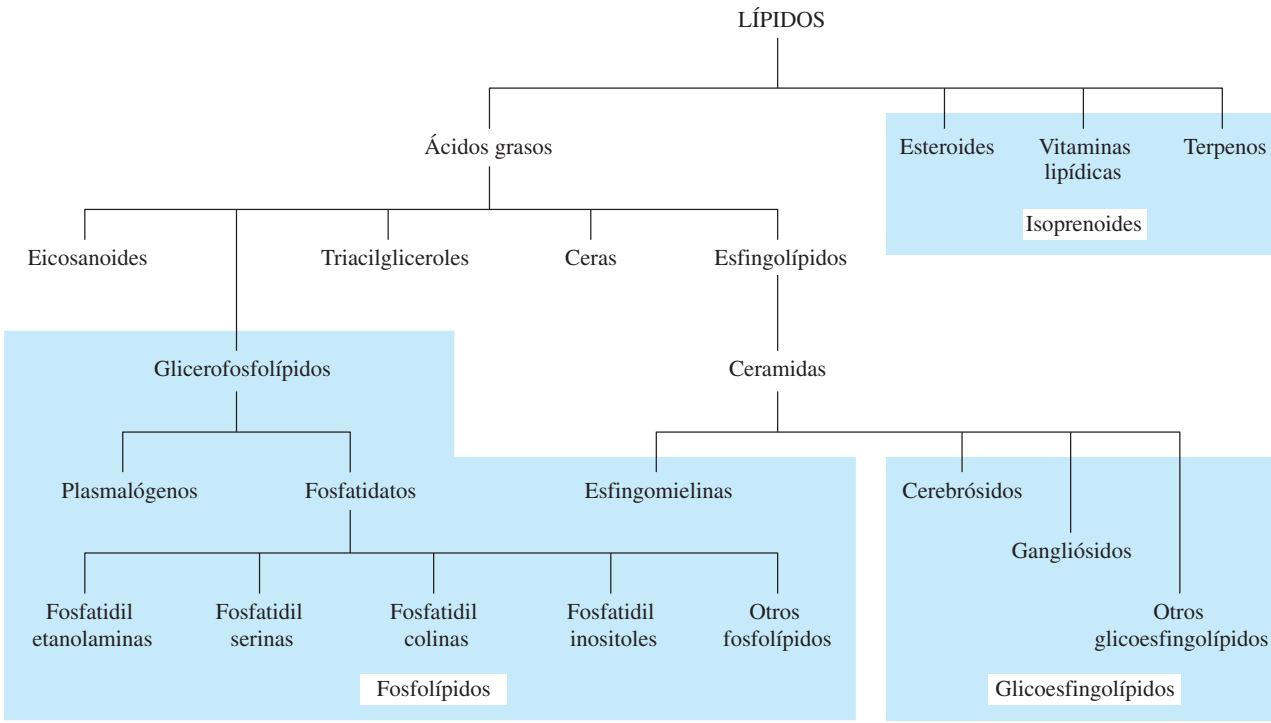


Figura 9.1 ▲
Relaciones estructurales en las clases principales de lípidos. Los ácidos grasos son los lípidos más simples. Muchas otras clases de lípidos contienen ácidos grasos, o se derivan de ellos. Los glicerofosfolípidos y las esfingomielinas contienen fosfato, y se clasifican como fosfolípidos. Los cerebrósidos y los gangliósidos contienen esfingosina y carbohidrato, y se clasifican como glicoesfingolípidos. Los esteroides, las vitaminas lipídicas y los terpenos se consideran isoprenoides, porque se relacionan con la molécula de isopreno, de cinco carbonos, más que con los ácidos grasos.

triacilgliceroles (grasas y aceites) es de moléculas intracelulares de almacenamiento de energía metabólica. También las grasas suministran aislamiento térmico y amortiguamiento a los animales. Las ceras en las paredes celulares, en los exoesqueletos y en la piel protegen a las superficies de algunos organismos. Algunos lípidos tienen funciones muy especializadas. Por ejemplo, las hormonas esteroides regulan e integran una variedad de actividades metabólicas en los animales, y los icosanoides participan en la regulación de la presión sanguínea, en la temperatura corporal y en la contracción de los músculos lisos en los mamíferos. Los gangliósidos y otros glicoesfingolípidos están en la superficie celular y pueden participar en el reconocimiento celular.

9.2 Ácidos grasos

En varias especies se han identificado más de 100 ácidos grasos distintos. Los ácidos grasos difieren entre sí en la longitud de sus colas de hidrocarburo, la cantidad de dobles enlaces carbono-carbono, las posiciones de los dobles enlaces en las cadenas y la cantidad de ramificaciones. Algunos ácidos grasos comunes en los mamíferos se muestran en la tabla 9.1. La mayor parte de los ácidos grasos tienen un pK_a aproximado de 4.5 a 5.0, y por consiguiente están ionizados al pH fisiológico. Los ácidos grasos son una forma de detergente, porque tienen una larga cola hidrofóbica y una cabeza polar (sección 2.4). Como es de esperar, la concentración de ácido graso libre en las células es muy baja, porque altas concentraciones de ácidos grasos libres podrían romper las membranas. La mayor parte de los ácidos grasos están formados por lípidos más complejos. Están unidos a otras moléculas mediante un enlace de éster en el grupo carboxilo terminal.

La biosíntesis de los ácidos grasos se describe en el capítulo 16.

TABLA 9.1 Algunos ácidos grasos comunes (formas aniónicas)

Cantidad de carbonos	Cantidad de dobles enlaces	Nombre común	Nombre IUPAC	Punto de fusión, °C	Fórmula molecular
12	0	Laurato	Dodecanoato	44	$CH_3(CH_2)_{10}COO^{\ominus}$
14	0	Miristato	Tetradecanoato	52	$CH_3(CH_2)_{12}COO^{\ominus}$
16	0	Palmitato	Hexadecanoato	63	$CH_3(CH_2)_{14}COO^{\ominus}$
18	0	Estearato	Octadecanoato	70	$CH_3(CH_2)_{16}COO^{\ominus}$
20	0	Araquidato	Icosanoato	75	$CH_3(CH_2)_{18}COO^{\ominus}$
22	0	Behenato	Docosanoato	81	$CH_3(CH_2)_{20}COO^{\ominus}$
24	0	Lignocerato	Tetracosanoato	84	$CH_3(CH_2)_{22}COO^{\ominus}$
16	1	Palmitoleato	*cis*-Δ^9-Hexadecenoato	–0.5	$CH_3(CH_2)_5CH{=}CH(CH_2)_7COO^{\ominus}$
18	1	Oleato	*cis*-Δ^9-Octadecenoato	13	$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7COO^{\ominus}$
18	2	Linoleato	*cis,cis*-$\Delta^{9,12}$-Octadecadienoato	–9	$CH_3(CH_2)_4(CH{=}CHCH_2)_2(CH_2)_6COO^{\ominus}$
18	3	Linolenato	todo *cis*-$\Delta^{9,12,15}$-Octadecatrienoato	–17	$CH_3CH_2(CH{=}CHCH_2)_3(CH_2)_6COO^{\ominus}$
20	4	Araquidonato	todo *cis*-$\Delta^{5,8,11,14}$-Eicosatetraenoato	–49	$CH_3(CH_2)_4(CH{=}CHCH_2)_4(CH_2)_2COO^{\ominus}$

Los ácidos grasos pueden indicarse ya sea por sus nombres establecidos por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, *International Union of Pure and Applied Chemistry*) o por sus nombres comunes. Los nombres comunes se usan para los ácidos grasos que se encuentran con más frecuencia.

La cantidad de átomos de carbono en los ácidos grasos más abundantes va de 12 a 20, y casi siempre es par, ya que se sintetizan mediante la adición consecutiva de unidades con dos carbonos. En la nomenclatura de IUPAC, al carbono carboxílico se le considera el C-1 y los demás átomos de carbono se numeran en secuencia. En la nomenclatura común se usan letras griegas para identificar a los átomos de carbono. El carbono adyacente al carbono carboxílico (C-2, en la nomenclatura de IUPAC) se le denomina α, y los demás carbonos tienen las letras β, γ, δ, ε, etcétera. (figura 9.2). La letra griega ω (omega) especifica el átomo de carbono más alejado del grupo carboxilo, cualquiera que sea la longitud de la cola de hidrocarburo. (ω es la última letra del alfabeto griego).

Los ácidos grasos que no contienen dobles enlaces carbono-carbono se llaman **saturados**, en tanto que los que tienen al menos un doble enlace carbono-carbono se clasifican como **no saturados** o **insaturados**. Los ácidos grasos no saturados que sólo tienen un doble enlace carbono-carbono se llaman **monoinsaturados**, en tanto que los que tienen dos o más se denominan **poliinsaturados**. La configuración de los dobles enlaces en los ácidos grasos no saturados es *cis*, en general. En la nomenclatura de IUPAC, se indican las posiciones de los dobles enlaces mediante el símbolo Δ^n, en el que el superíndice n

RECUADRO 9.1 Nombres comunes de los ácidos grasos

Laurato	presente en aceite de laurel (*Laurus nobilis*) (1873)
Miristato	aceite de nuez moscada (*Myristica fragrans*) (1848)
Palmitato	del aceite de palma (1857)
Estearato	de *stéarique*, palabra francesa que indica grasa de novillos o sebo (1831)
Araquidato	presente en aceite de cacahuate (*Arachis hypogaea*) (1866)
Behenato	corrupción de "ben", de *ben-nut* = semillas del árbol de balsamita (1873)
Lignocerato	probablemente de *lignum*, madera en latín (~1900)
Oleato	de *oleum*, aceite en latín (1899)
Linoleato	se encuentra en aceite de linaza (*lin* + *oleato*) (1857)

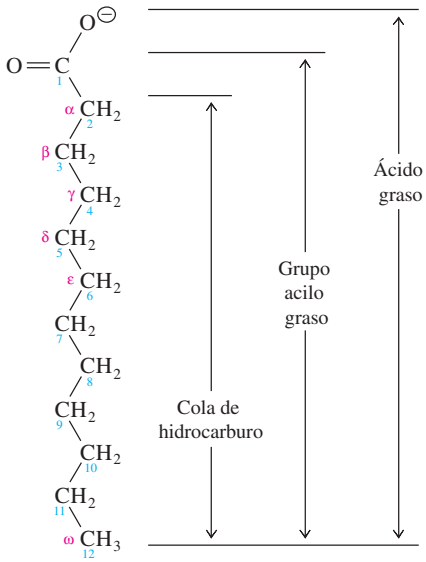


Figura 9.2 ▲
Estructura y nomenclatura de los ácidos grasos. Los ácidos grasos están formados por una larga cola de hidrocarburo que termina en un grupo carboxilo. Como el pK_a del grupo carbonilo es aproximadamente de 4.5 a 5.0, los ácidos grasos son aniónicos al pH fisiológico. En la nomenclatura de IUPAC, los carbonos se numeran comenzando en el carbono del carboxilo. En la nomenclatura común, el átomo de carbono adyacente al carbono carboxílico se designa como α y los carbonos restantes se indican con las letras β, γ, δ, etc. El átomo de carbono más alejado del carbono carboxílico es el carbono ω, sea cual sea la longitud de la cola. El ácido graso que se muestra, el laurato (o dodecanoato), tiene 12 átomos de carbono y no tiene dobles enlaces carbono-carbono.

representa el átomo de carbono de menor número en cada par con doble enlace (tabla 9.1). Los dobles enlaces de la mayor parte de los ácidos grasos poliinsaturados están separados por un grupo metileno, y en consecuencia no están conjugados.

Una notación taquigráfica para identificar los ácidos grasos usa dos números separados por dos puntos (:); el primero indica la cantidad de átomos de carbono en el ácido graso, y el segundo, la cantidad de dobles enlaces carbono-carbono, con sus posiciones indicadas como superíndices después de una letra griega Δ. En esta notación, el palmitato se escribe como 16:0, el oleato como 18:1 Δ^9, y el araquidonato como 20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$. También se pueden especificar los ácidos grasos no saturados por la localización del último doble enlace de la cadena. Algunos ácidos grasos se llaman ω-3 (por ejemplo 18:3 $\Delta^{9,12,15}$), ω-6 (por ejemplo, 18:2 $\Delta^{9,12}$) u ω-9 (por ejemplo 18:1 Δ^9).

Las propiedades físicas de los ácidos grasos saturados y no saturados son muy variadas. Típicamente, los ácidos grasos saturados son sólidos céreos a temperatura ambiente (22 °C), en tanto que los ácidos grasos no saturados son líquidos a esta temperatura. La longitud de la cadena de hidrocarburo en un ácido graso, y su grado de insaturación, influyen sobre el punto de fusión. Compárense los puntos de fusión que se ven en la tabla 9.1 para los ácidos grasos saturados laurato (12:0), miristato (14:0) y palmitato (16:0). A medida que aumentan las longitudes de las colas de hidrocarburo, también aumentan los puntos de fusión de los ácidos grasos saturados. A medida que se alarga la cadena, aumenta la cantidad de interacciones de Van der Waals entre las colas vecinas de hidrocarburo, por lo que se requiere más energía para separar las interacciones.

Compárense las estructuras de estearato (18:0), oleato (18:1) y linolenato (18:3) en las figura 9.3 y 9.4. La cola de hidrocarburo saturado en el estearato es flexible, ya que puede haber rotación en torno a cada enlace carbono-carbono. En un cristal de ácido esteárico, las cadenas de hidrocarburo están extendidas, y empacadas estrechamente entre sí. La presencia de dobles enlaces *cis* en el oleato y linolenato produce dobleces pronunciados en las cadenas de hidrocarburo, ya que se estorba la rotación respecto de los dobles enlaces. Estos dobleces evitan un empacamiento estrecho, así como intensas interacciones de Van der Waals entre las cadenas de hidrocarburo. En consecuencia, los ácidos grasos no saturados *cis* tienen menores puntos de fusión que los ácidos grasos saturados. A medida que aumenta el grado de insaturación, los ácidos grasos se vuelven más fluidos. Por ejemplo, el ácido esteárico (punto de fusión 70 °C) es un sólido a la temperatura del organismo, en tanto que el ácido oleico (punto de fusión 13 °C) y el ácido linolénico (punto de fusión –17 °C) son líquidos.

Como se mencionó antes, los ácidos grasos libres sólo se encuentran en cantidades de huellas en las células vivas. La mayor parte de los ácidos grasos está esterificada con glicerina u otros compuestos vertebrales para formar moléculas más complejas de lípidos. En los ésteres y otros derivados de ácidos carboxílicos, la mitad RC═O que aporta el ácido se llama grupo acilo. En la nomenclatura común, los lípidos complejos que contienen grupos acilo graso específicos reciben su nombre de acuerdo con el ácido

RECUADRO 9.2 Ácidos grasos *trans* y margarina

Aunque la configuración de la mayor parte de los dobles enlaces en los ácidos grasos no saturados es *cis*, hay algunos, en la dieta humana, que tienen la configuración *trans*. Los ácidos grasos *trans* pueden originarse en fuentes animales, como productos lácteos y carnes de rumiantes. La mayor parte de los ácidos grasos *trans* comestibles están, sin embargo, en forma de aceites vegetales hidrogenados en algunas margarinas o mantecas. Los ácidos grasos monoinsaturados *trans* en la dieta pueden aumentar las concentraciones de colesterol en el plasma, así como de los triglicéridos, y por eso su ingestión puede aumentar el riesgo de enfermedades cardiovasculares.

Los aceites vegetales, como el de maíz y de girasol, se pueden convertir en sustancias semisólidas "untables" llamadas margarinas. Las margarinas se pueden obtener por hidrogenación parcial o completa de los dobles enlaces en los aceites vegetales. El proceso mismo de hidrogenación no sólo satura a los dobles enlaces carbono-carbono de ésteres de ácidos grasos, sino que también puede cambiar la configuración de los dobles enlaces restantes de *cis* a *trans*. Las propiedades físicas de esos ácidos grasos *trans* son parecidas a las de los ácidos grasos saturados. Para reducir el consumo de ácidos grasos *trans*, muchas margarinas se producen hoy a partir de aceites vegetales sin hidrogenarlos, agregando otros componentes comestibles, como polvo de nata de leche.

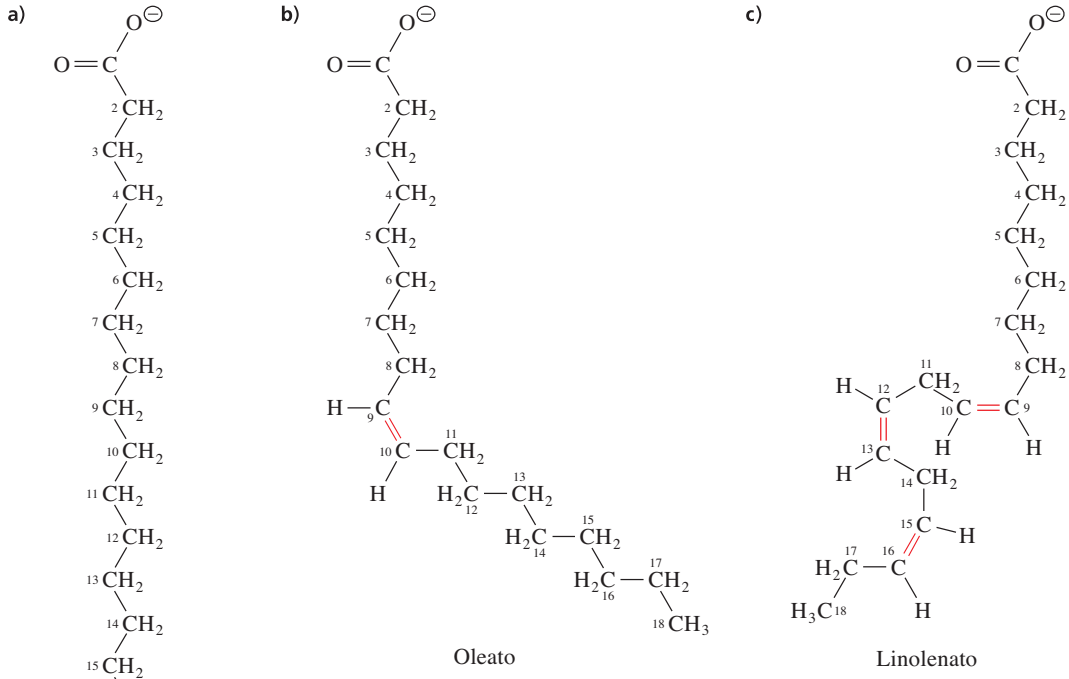
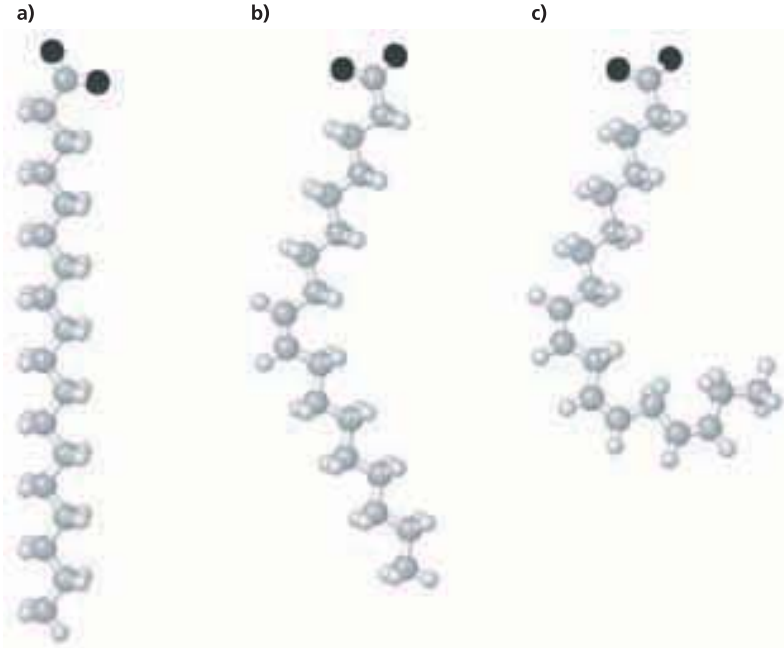


Figura 9.3 ▲
Estructuras químicas de tres ácidos grasos con C_{18}. **a)** Estearato (octadecanoato), un ácido graso saturado. **b)** Oleato (*cis*-Δ^9-octadecenoato), un ácido graso monoinsaturado. **c)** Linolenato (todo-cis-$\Delta^{9,12,15}$-octadecatrienolato), un ácido graso poliinsaturado. Los dobles enlaces *cis* producen arrugas en las colas de los ácidos grasos no saturados. El linolenato es una molécula muy flexible, y puede asumir una diversidad de conformaciones.



◀ **Figura 9.4**
Modelos de bolas y palillos de tres ácidos grasos con C_{18}. **a)** Estearato, **b)** oleato y **c)** linolenato. Clave de colores: carbono = gris, hidrógeno = blanco, oxígeno = negro.

Muchas vitaminas también son componentes esenciales de la dieta de los mamíferos, porque no pueden sintetizarlas. Además de las vitaminas y los ácidos grasos esenciales, en el capítulo 17 se verá que los mamíferos no pueden sintetizar muchos aminoácidos.

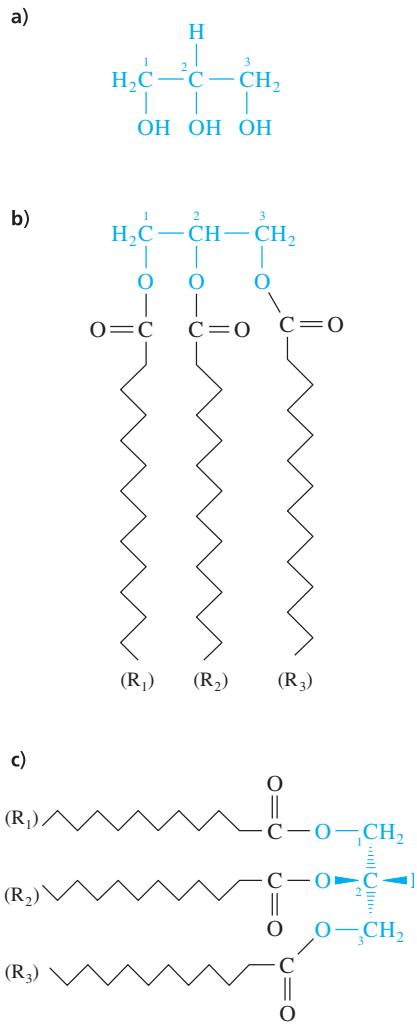


Figura 9.5 ▲
Estructura de un triacilglicerol. El glicerol **a)** es la columna vertebral a la que se esterifican tres residuos de acilo graso **b)**. Aunque la glicerina no es quiral, el C-2 de un triacilglicerol es quiral cuando los grupos acilo unidos al C-1 y C-3 (R_1 y R_3) son distintos. La estructura general de un triacilglicerol se ve en **c)**, orientada para compararla con la estructura del L-gliceraldehído (figura 8.1). Esta orientación permite la numeración estereoespecífica de los derivados de la glicerina, con el C-1 arriba y C-3 abajo.

graso precursor. Por ejemplo, los ésteres del laurato se llaman ésteres de lauroílo, y los de linoleato se llaman ésteres de linoleoílo (un grupo laurilo es el alcohol análogo del grupo lauroil acilo).

La abundancia relativa de determinados ácidos grasos varía de acuerdo con el tipo de organismo, su órgano (en los organismos multicelulares) y su fuente alimenticia. Los ácidos grasos más abundantes en los animales suelen ser oleato (18:1), palmitato (16:0) y estearato (18:0). Los mamíferos requieren ciertos ácidos grasos poliinsaturados en su dieta, que no pueden sintetizar, como linoleato (18:2), abundante en los aceites vegetales, y linolenato (18:3), que abunda en aceites vegetales y de pescado. Esos ácidos grasos se llaman ácidos grasos esenciales. Los mamíferos pueden sintetizar otros ácidos grasos poliinsaturados si tienen un suministro adecuado de linoleato y linolenato.

Muchos ácidos grasos, además de los de la tabla 9.1, existen en la naturaleza. Por ejemplo, los ácidos grasos que contienen anillos de ciclopropano se encuentran en bacterias. Los ácidos grasos de cadena ramificada son componentes comunes de las membranas bacterianas, y también están en las plumas de los patos. Muchos otros ácidos grasos son raros, y tienen funciones muy especializadas.

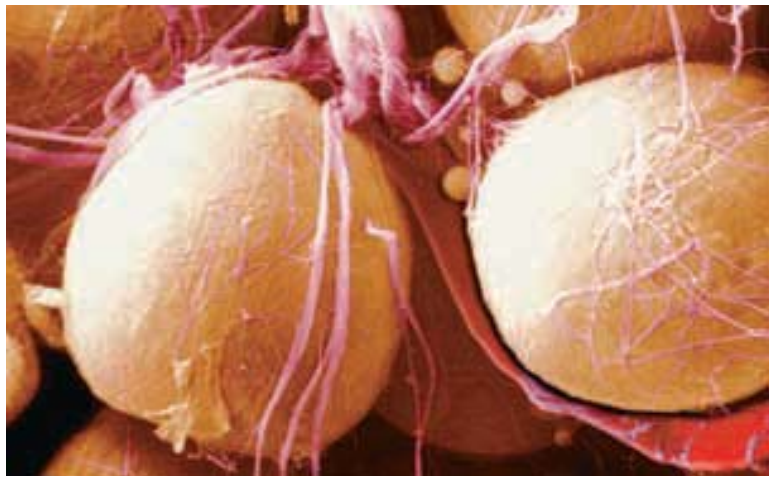
9.3 Triacilgliceroles

Los ácidos grasos son combustibles metabólicos importantes, en especial en los mamíferos. Como los átomos de carbono de los ácidos grasos están más reducidos que los de las proteínas o los carbohidratos, la oxidación de los ácidos grasos produce más energía (~37 kJ g^{-1}) que la oxidación de proteínas o carbohidratos (~16 kJ g^{-1} cada uno). En general, los ácidos grasos se almacenan en forma de lípidos neutros llamados **triacilgliceroles** o **triglicéridos** (este último nombre es histórico). Como indica su nombre, los triacilgliceroles están formados por tres residuos de acilo graso esterificados con glicerina, un azúcar alcohol de tres carbonos (figura 9.5). Los triacilgliceroles son muy hidrofóbicos. En consecuencia, a diferencia de otros carbohidratos, se pueden almacenar en células en forma anhidra, esto es, las moléculas no están solvatadas por agua, lo cual ocuparía espacio y añadiría masa, reduciendo la eficiencia del almacenamiento de energía.

Las grasas y los aceites son mezclas de triacilgliceroles. Pueden ser sólidos (grasas) o líquidos (aceites), dependiendo de sus composiciones de ácidos grasos y de la temperatura. Los triacilgliceroles que sólo contienen grupos acilo graso saturado y de cadena larga tienden a ser sólidos a la temperatura corporal, y los que contienen grupos acilo graso no saturados o de cadena corta, tienden a ser líquidos. Una muestra de triacilgliceroles naturales puede contener hasta 20 o 30 especies moleculares que difieren en la composición de sus ácidos grasos . La tripalmitina, en las grasas animales, contiene tres residuos de ácido palmítico. La trioleína, que contiene tres residuos de ácido oleico, es el principal triacilglicerol en el aceite de oliva.

La mayor parte de los lípidos en la dieta humana promedio son triacilgliceroles. Esos lípidos se descomponen en el intestino delgado por acción de las lipasas. Esas enzimas se sintetizan como zimógenos en el páncreas, y son secretadas en el intestino delgado, donde se activan. La lipasa pancreática cataliza la hidrólisis de los ésteres primarios (en el C-1 y C-3) de los triacilgliceroles, liberando los ácidos grasos y generando monoacilgliceroles. Como los lípidos no son solubles en el agua, la digestión de los lípidos se lleva a cabo en presencia de detergentes enérgicos, llamados sales biliares (sección 9.6), que son derivados anfipáticos del colesterol. Las micelas de las sales biliares solubilizan los ácidos grasos y los monoacilgliceroles, de tal modo que se pueden difundir y ser absorbidos por las células de la pared intestinal. Los lípidos se transportan por el organismo en forma de complejos de lípido y proteína, llamados lipoproteínas.

En la mayor parte de las células, los triacilgliceroles coalescen en forma de gotitas de grasa. Esas gotitas a veces se ven cerca de las mitocondrias en células que se basan en ácidos grasos para obtener su energía metabólica. En los mamíferos, la mayor parte de la grasa se almacena en el tejido adiposo, formado por células especializadas llamadas adipocitos. Cada adipocito contiene una gota grande de grasa que forma casi todo el volumen de la célula (figura 9.6). Aunque están distribuidos en los organismos de los mamíferos, la mayor parte de los tejidos adiposos están justo bajo la piel y en la cavidad



◀ Figura 9.6
Tejido adiposo. Los grandes adipocitos están llenos de gotitas de grasa. Están incrustados en una matriz de colágena. La mayor parte de las células están cerca de capilares. Crédito de foto: Visuals Unlimited.

abdominal. La abundante grasa subcutánea sirve como depósito de almacenamiento de energía y como aislador térmico. La grasa subcutánea es notable en especial en los mamíferos acuáticos.

Las estructuras y funciones de las lipoproteínas y el almacenamiento y la movilización de los lípidos en los adipocitos se describen en la sección 16.9.

9.4 Glicerofosfolípidos

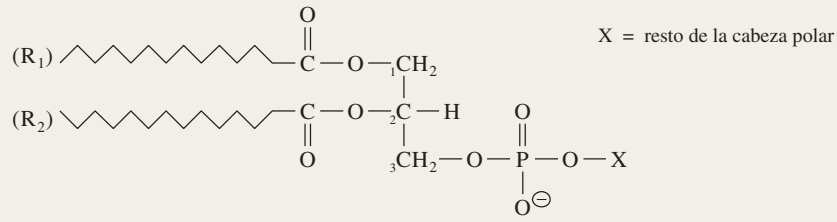
Aunque los triacilgliceroles son los lípidos más abundantes en los mamíferos (por su peso), no se encuentran en las membranas biológicas. Los lípidos más abundantes en la mayor parte de las membranas son los **glicerofosfolípidos** (que también se llaman fosfoglicéridos); como los triacilgliceroles tienen un soporte de glicerol. Los glicerofosfolípidos más sencillos, los fosfatidatos, consisten en dos grupos acilo graso esterificados en el C-1 y C-2 del 3-fosfato de glicerol (tabla 9.2). Nótese que hay tres grupos acilo graso esterificados con la glicerina en los triacilgliceroles, en tanto que sólo hay dos grupos acilo graso (R_1 y R_2) en los glicerofosfolípidos. La propiedad distintiva de los grupos acilo (R_1 y R_2) de los glicerofosfolípidos es la presencia de un grupo fosfato en el C-3 del soporte del glicerol. Las estructuras de los glicerofosfolípidos se pueden dibujar como derivados del L-glicerol 3-fosfato (o 3-fosfato de L-glicerol), con el sustituyente en el C-2 a la izquierda en una proyección de Fischer, como en la tabla 9.2. Para simplificar, con frecuencia se mostrarán esos compuestos como estructuras no referidas a su estereoquímica.

Los fosfatidatos están presentes en pequeñas cantidades como intermedios en la biosíntesis o descomposición de glicerofosfolípidos más complejos. En la mayor parte de los glicerofosfolípidos, el grupo fosfato está esterificado con glicerol y otro compuesto que tenga un grupo —OH. La tabla 9.2 contiene algunos tipos comunes de glicerofosfolípidos. Nótese que éstos son moléculas anfipáticas, con una cabeza polar y colas no polares. En la figura 9.7 de la página 261 se ven las estructuras de tres tipos de glicerofosfolípidos: fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilcolina.

Cada tipo de glicerofosfolípido consiste en una familia de moléculas con el mismo grupo en la cabeza polar, y distintas cadenas de acilo graso. Por ejemplo, las membranas de los glóbulos rojos humanos contienen cuando menos 21 especies distintas de fosfatidilcolina que difieren entre sí en las cadenas de acilo graso esterificadas en el C-1 y C-2 del respaldo de glicerina. En general, los glicerofosfolípidos tienen ácidos grasos saturados esterificados en el C-1 y ácidos grasos no saturados esterificados en el C-2. Los principales glicerofosfolípidos de membrana en *Escherichia coli* son fosfatidil-etanolamina y fosfatidilglicerol.

Para determinar las estructuras de los glicerofosfolípidos y las identidades de sus ácidos grasos individuales se puede usar una diversidad de fosfolipasas. Las posiciones específicas de ácidos grasos en los glicerofosfolípidos se pueden determinar usando

TABLA 9.2 Algunos tipos comunes de glicerofosfolípidos



Precursor de X (HO—X)	Fórmulas de —O—X	Nombre del glicerofosfolípido resultante
Agua	—O—H	Fosfatidato
Colina	—O—$CH_2CH_2\overset{\oplus}{N}(CH_3)_3$	Fosfatidilcolina
Etanolamina	—O—$CH_2CH_2\overset{\oplus}{N}H_3$	Fosfatidiletanolamina
Serina	—O—CH_2—CH($\overset{\oplus}{N}H_3$)—$COO^{\ominus}$	Fosfatidilserina
Glicerina	—O—CH_2CH(OH)—CH_2OH	Fosfatidilglicerol
Fosfatidil-glicerol	—O—CH_2CH(OH)—CH_2—O—P(=O)($O^{\ominus}$)—O—CH_2CH(CH_2OCR_3)(O$COCR_4$)	Difosfatidilglicerol (cardiolipina)
myo-Inositol	—O—C$_6$H(OH)—C$_5$H(OH)—C$_4$H(OH)—C$_3$H(OH)—C$_2$H(OH)—C$_1$H(OH)	Fosfatidilinositol

fosfolipasa A_1 y fosfolipasa A_2, que catalizan en forma específica la hidrólisis de los enlaces de éster en el C-1 y C-2, respectivamente (figura 9.8, página 261). La fosfolipasa A_2 es la principal en el jugo pancreático, y es la responsable de la digestión de fosfolípidos de membrana en la dieta. También está presente en los venenos de víbora, abeja y avispa. Altas concentraciones de los productos de la fosfolipasa A_2 pueden romper las membranas celulares. Así, la inyección de veneno de víbora en la sangre puede causar lisis de las membranas de los glóbulos rojos que puede poner en peligro la vida. La fosfolipasa C cataliza la hidrólisis del enlace P—O entre glicerina y fosfato, para liberar diacilglicerol, y la fosfolipasa D convierte los glicerofosfolípidos en fosfatidatos.

La otra clase principal de glicerofosfolípidos es la de los **plasmalógenos**, y difiere de los fosfatidatos porque tiene el sustituyente hidrocarburo en el grupo hidroxilo del C-1 de la glicerina, unido por un enlace de éter vinílico, y no enlace de éster (figura 9.9,

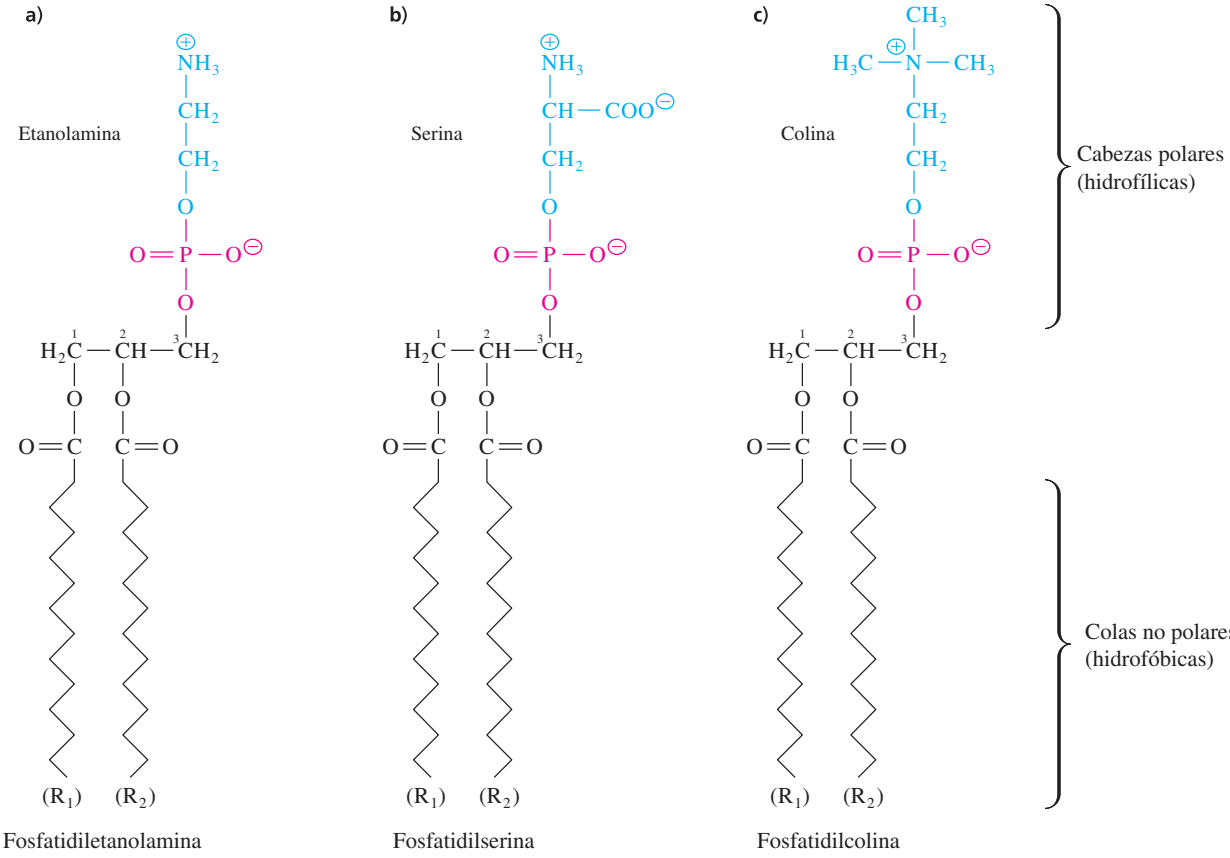
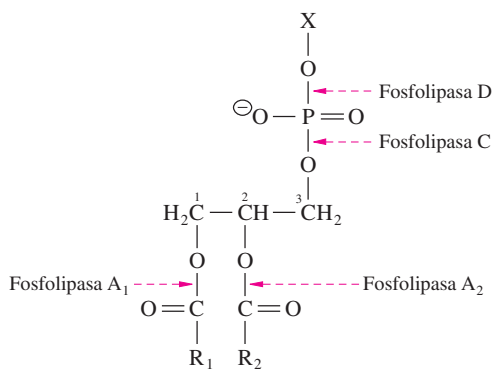


Figura 9.7 ▲
Estructuras de **a)** fosfatidiletanolamina, **b)** fosfatidilserina y **c)** fosfatidilcolina. Los grupos funcionales derivados de los alcoholes esterificados se muestran en gris claro. Ya que cada uno de estos lípidos pueden contener muchas combinaciones de grupos acilo graso, el nombre general se refiere a una familia de compuestos y no a una sola molécula.

página 262). La etanolamina o la colina se suelen esterificar al grupo fosfato de los plasmalógenos. Éstos forman un 23% de los glicerofosfolípidos en el sistema nervioso central humano, y también se encuentran en las membranas de los tejidos nervioso periférico y muscular.



◀ Figura 9.8
Acción de cuatro fosfolipasas. Las fosfolipasas A_1, A_2, C y D se pueden usar para hacer una disección de la estructura del glicerofosfolípido. Las fosfolipasas catalizan la eliminación selectiva de ácidos grasos del C-1 o C-2, o convierten los glicerofosfolípidos en diacilgliceroles o en fosfatidatos.

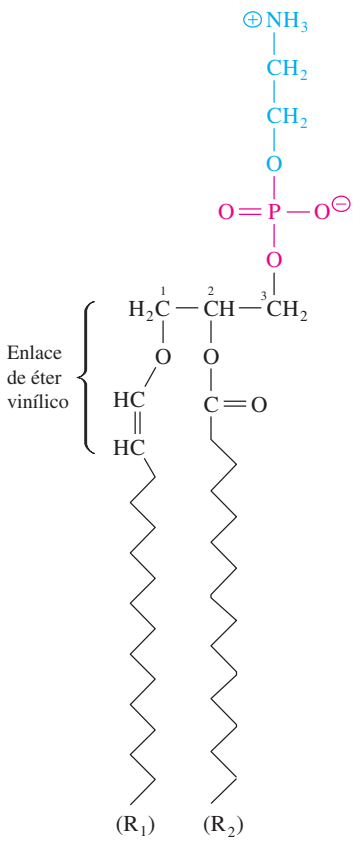


Figura 9.9 ▲
Estructura de etanolamina plasmalógeno. Un hidrocarburo está unido al grupo hidroxilo en el C-1 de la glicerina, y forma un éter vinílico.

9.5 Esfingolípidos

Después de los glicerofosfolípidos, los lípidos más abundantes en las membranas vegetales y animales son los **esfingolípidos**. En los mamíferos tienen abundancia especial en tejidos del sistema nervioso central. La mayor parte de las bacterias no tienen esfingolípidos. El respaldo estructural de los esfingolípidos es la esfingosina (*trans*-4-esfingenina), un alcohol no ramificado de C_{18}, con un doble enlace *trans* entre el C-4 y C-5, un grupo amino en el C-2 y grupos hidroxilo en el C-1 y C-3 (figura 9.10a). La **ceramida** está formada por un grupo acilo graso unido al grupo amino del C-2 en la esfingosina, por un enlace de amida (figura 9.10b). Las ceramidas son los precursores metabólicos de todos los esfingolípidos. Las tres grandes familias de esfingolípidos son las esfingomielinas, los cerebrósidos y los gangliósidos. De ellos, sólo las esfingomielinas contienen fosfato, y se clasifican como fosfolípidos; los cerebrósidos y los gangliósidos contienen residuos de carbohidrato y se clasifican como glicoesfingolípidos.

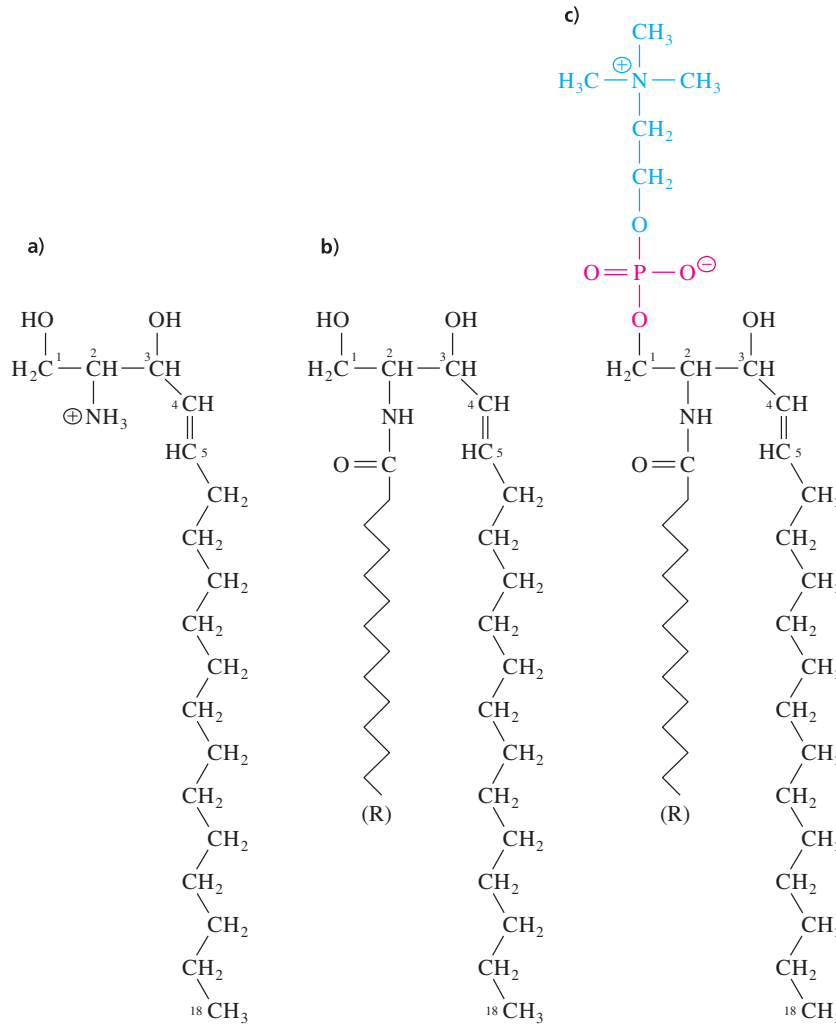


Figura 9.10 ▲
Estructura de esfingosina, ceramida y esfingomielina. **a)** La esfingosina, columna vertebral de los esfingolípidos, es un alcohol de cadena larga con un grupo amino en el C-2. **b)** Las ceramidas tienen un grupo de acilo graso de cadena larga, unido al grupo amino de la esfingosina. **c)** Las esfingomielinas tienen un grupo fosfato (en gris oscuro) unido al grupo hidroxilo en el C-1 de una ceramida, y un grupo colina (gris claro) unido al fosfato.

En las **esfingomielinas**, la fosfocolina está unida al grupo hidróxido en el C-1 de una ceramida (figura 9.10c). Nótese la semejanza de la esfingomielina y la fosfatidilcolina (figura 9.7c); ambas moléculas son zwitteriones que contienen colina, fosfato y dos colas hidrofóbicas largas. Las esfingomielinas existen en las membranas plasmáticas de la mayor parte de las células de mamíferos, y son componente principal de las vainas de mielina que rodean a ciertas células nerviosas.

Los **cerebrósidos** son glicoesfingolípidos que contienen un residuo de monosacárido unido a un enlace β-glicosídico al C-1 de una ceramida. Los galactocerebrósidos, llamados también galactosilceramidas, tienen un solo residuo de β-D-galactosilo como grupo de cabeza polar (figura 9.11). Los galactocerebrósidos abundan en el tejido nervioso, y forman casi el 15% de los lípidos en las vainas de mielina. Muchos otros tejidos en los mamíferos contienen glucocerebrósidos, ceramidas con un grupo β-D-glucosilo en la cabeza. En algunos glicoesfingolípidos, una cadena lineal hasta de tres residuos más de monosacárido está unida a la mitad de galactosilo o glucosilo de un cerebrósido.

Los **gangliósidos** son glicoesfingolípidos más complejos, donde las cadenas de oligosacárido que contienen ácido *N*-acetilneuramínico (NeuNAc) están unidas a una ceramida. El NeuNAc (figura 8.15) es un derivado acetilado del carbohidrato ácido siálico, y forma los grupos de cabeza en gangliósidos aniónicos. En la figura 9.12 se muestra la estructura de un ganglósido representativo, G_{M2}. La M en G_{M2} representa monosialo, es decir, un residuo de NeuNAc; G_{M2} fue el segundo monosialo ganglósido que se caracterizó, por eso el subíndice 2.

Se han caracterizado más de 60 variedades de gangliósidos. Su diversidad estructural se debe a variaciones en la composición y la secuencia de los residuos de azúcar. En todos los gangliósidos, la ceramida está unida a través de su C-1 a un residuo β-glucosilo, que a su vez está enlazado a un residuo β-galactosilo.

Los gangliósidos están en las superficies celulares, con las dos cadenas de hidrocarburo de la mitad de ceramida incrustadas en la membrana plasmática, y los oligosacáridos en la superficie extracelular. Los gangliósidos y otros glicoesfingolípidos son parte del repertorio en la superficie celular de diversas cadenas de oligosacárido, junto con las glicoproteínas. En forma colectiva, esos marcadores proporcionan a las células marcas superficiales distintivas que pueden servir en reconocimiento celular y comunicación de una célula a otra. Estructuras parecidas a los antígenos de grupo hemático ABO en la superficie de las células humanas (recuadro 8.2) pueden ser componentes de oligosacárido en glicoesfingolípidos, además de estar unidas a proteínas formando glicoproteínas. La composición de los glicoesfingolípidos de membrana puede cambiar en forma notable durante el desarrollo de tumores malignos.

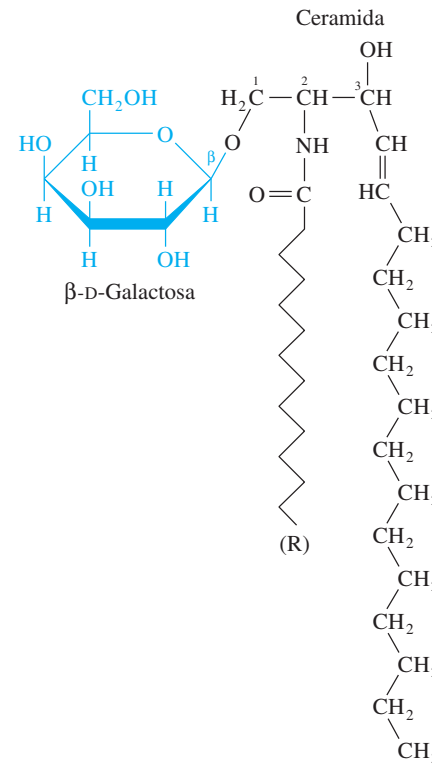


Figura 9.11 ▲
Estructura de un galactocerebrósido. La β-D-galactosa (en gris claro) está unida al grupo hidroxilo en el C-1 de una ceramida (en negro).

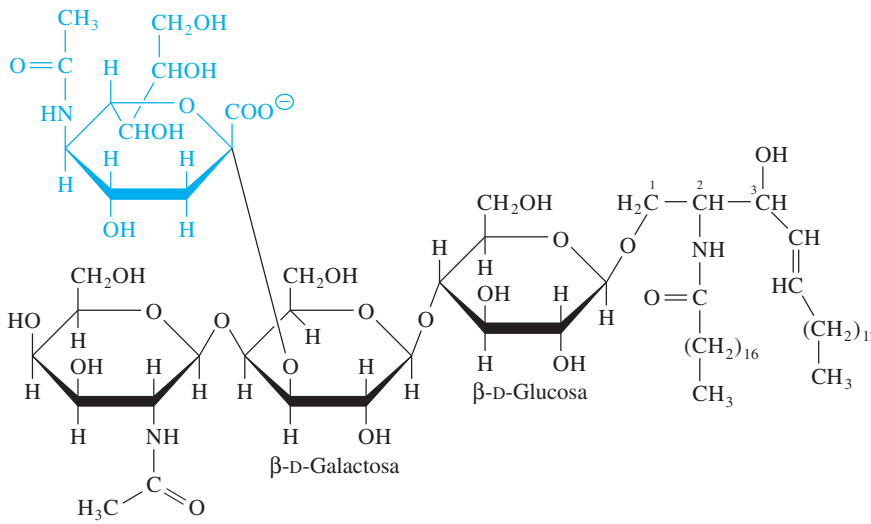


Figura 9.12 ▲
El ganglósido G_{M2}. El residuo de ácido *N*-acetilneuramínico se muestra en gris claro.

Los defectos genéticamente heredados en el metabolismo de gangliósidos son los responsables de varias enfermedades debilitantes, y con frecuencia letales, como la enfermedad de Tay-Sachs y la gangliosidosis (o gangliósido lipidosis) generalizada. Ciertos defectos genéticos raros provocan deficiencias de enzimas responsables de la degradación de esfingolípidos en los lisosomas celulares. En la enfermedad de Tay-Sachs hay deficiencia de una hidrolasa que cataliza la eliminación de *N*-acetilgalactosamina de G_{M2}. La acumulación de G_{M2} hace que los lisosomas se hinchen y los tejidos se agranden. En el tejido nervioso central, donde hay poco espacio para la expansión, mueren las células nerviosas; eso provoca ceguera, retardo mental y muerte.

9.6 Esteroides

Los esteroides son una tercera clase de lípidos que se encuentran en las membranas de los eucariotas, y muy rara vez en las bacterias. Los esteroides, junto con las vitaminas lipídicas y los terpenos, se clasifican como isoprenoides porque sus estructuras se relacionan con la molécula de isopreno, de cinco carbonos (figura 9.13). Los esteroides contienen cuatro anillos fundidos, tres de seis carbonos identificados como A, B y C, y un anillo D de cinco carbonos. La estructura anular característica se deriva del escaleno (figura 9.14a). Los sustituyentes del sistema anular casi plano pueden apuntar hacia abajo (la configuración α) o hacia arriba (la configuración β). En la figura 9.14 se ven las estructuras de varios esteroides.

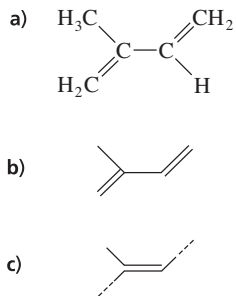


Figura 9.13 ▲
Isopreno (2-metil-1,3-butadieno, la unidad estructural básica de los isoprenoides. **a)** Estructura química. **b)** Esqueleto de carbonos. **c)** Unidad de isopreno, donde las líneas interrumpidas indican enlaces covalentes para unidades adyacentes.

En la sección 16.6 se describe la síntesis del colesterol y productos afines.

El esteroide colesterol es el componente importante de las membranas plasmáticas animales, pero sólo se encuentra rara vez en las plantas, y nunca en los procariotas, protistas u hongos. En realidad, el colesterol es un **esterol** porque tiene un grupo hidroxilo en el C-3. Otros esteroides son los de las plantas, hongos y levaduras (que también tienen un grupo hidroxilo en el C-3); las hormonas esteroides de mamíferos (como estrógenos, andrógenos, progestinas y corticosteroides suprarrenales), y las sales biliares. Estos esteroides difieren en la longitud de la cadena lateral unida al C-17, y en la cantidad y colocación de grupos metilo, dobles enlaces, grupos hidroxilo y, en algunos casos, grupos ceto. Las membranas procarióticas contienen escaleno y algunos lípidos no esteroides relacionados que no tienen la estructura anular completa de los esteroides.

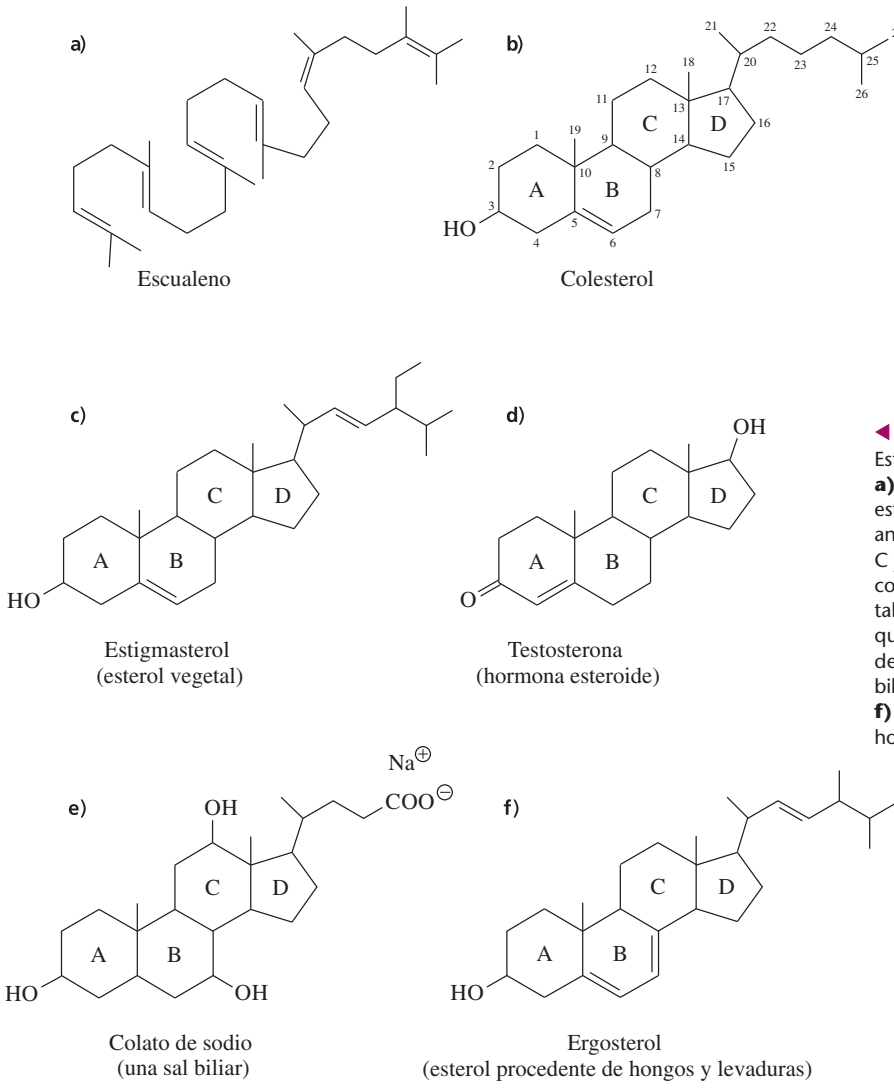
El colesterol se acumula con frecuencia en depósitos lipídicos (placas) en las paredes de los vasos sanguíneos. Se han identificado esas placas en las enfermedades cardiovasculares, que pueden provocar ataques al corazón. Muchas personas limitan su ingestión de colesterol.

A pesar de su implicación en enfermedades cardiovasculares, el colesterol tiene participación esencial en la bioquímica de los mamíferos. Es sintetizado por las células de mamíferos. No sólo es un componente de ciertas membranas, sino también un precursor esencial de las hormonas esteroides y de las sales biliares. El sistema de anillos fundidos del colesterol, que se ve al lado de la figura 9.15, lo hace menos flexible que la mayor parte de los demás lípidos. El resultado es que el colesterol modula la fluidez de las membranas celulares de mamíferos, como se verá más adelante en este capítulo.

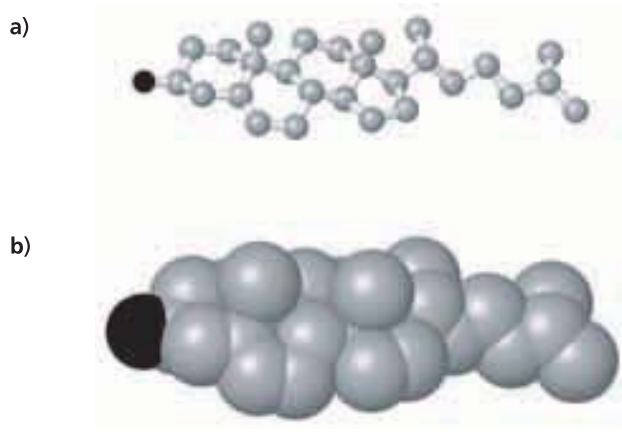
Como el grupo hidroxilo en el C-3 es su único componente polar, el colesterol es mucho más hidrofóbico que los glicerofosfolípidos y los esfingolípidos. De hecho, la concentración de colesterol libre en agua sólo es 10^{-8} M. La esterificación de un ácido graso con el grupo hidroxilo del C-3 forma un éster de colesterilo (figura 9.16, página 266). Ya que el grupo 3-acilo del éster es no polar, un éster de colesterilo es todavía más hidrofóbico que el mismo colesterol. El colesterol se convierte en ésteres de colesterilo para su almacenamiento en las células, o para su transporte en el torrente sanguíneo. Como son en esencia insolubles en agua, el colesterol y sus ésteres deben acomplejarse con fosfolípidos y proteínas anfipáticas en lipoproteínas para su transporte (sección 16.1B).

9.7 Otros lípidos de importancia biológica

Hay muchas clases de lípidos que no se encuentran en las membranas. Incluyen distintos compuestos, como ceras, eicosanoides y algunos isoprenoides. Los lípidos no de membrana tienen diversas funciones especializadas, y ya se han encontrado algunas de ellas (por ejemplo, las vitaminas lipídicas).

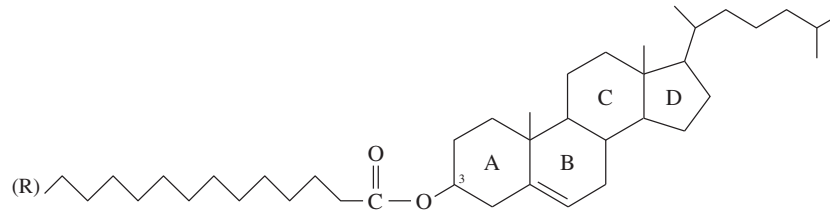


◀ Figura 9.14
Estructuras de varios esteroides. El escualeno **a)** es el precursor de la mayor parte de los esteroides. Los esteroides contienen cuatro anillos fundidos (indicados con las letras A, B, C y D). **b)** Colesterol. **c)** Estigmasterol, componente común en las membranas vegetales. **d)** Testosterona, hormona esteroide que interviene en el desarrollo masculino de los animales. **e)** Colato de sodio, una sal biliar que ayuda en la digestión de los lípidos. **f)** Ergosterol, compuesto procedente de hongos y levaduras.



◀ Figura 9.15
Colesterol. **a)** Modelo de bolas y palillos, con el átomo de oxígeno (en negro) en el extremo. No se muestran los átomos de hidrógeno. El sistema de anillo fundido del colesterol es casi plano. **b)** Modelo volumétrico. Los sustituyentes que sobresalen arriba del plano de los anillos están en la configuración β.

Figura 9.16 ▶
Éster de colesterilo.



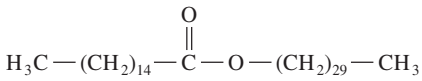
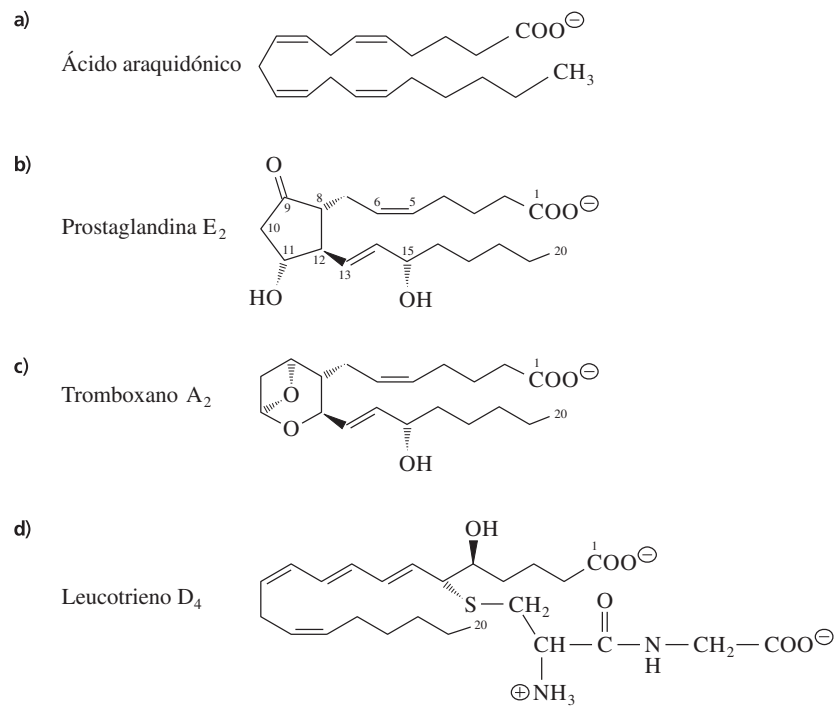


Figura 9.17 ▲
Palmitato de miricilo, una cera.

Las **ceras** son ésteres no polares de ácidos grasos de cadena larga y alcoholes monohidroxílicos de cadena larga. Por ejemplo, el palmitato de miricilo, uno de los principales componentes de la cera de abejas, es el éster de palmitato (16:0) y del alcohol miricílico, de 30 carbonos (figura 9.17). La hidrofobicidad del palmitato de miricilo hace que la cera de abejas sea muy insoluble en agua, y su alto punto de fusión (debido a las cadenas largas de hidrocarburo saturado) hace que esa cera sea dura y sólida a las temperaturas peculiares de la intemperie. Las ceras están muy distribuidas en la naturaleza. Proporcionan cubiertas protectoras impermeables a las hojas y frutos de ciertas plantas, y en la piel, cuero, plumas y exoesqueletos de animales. La cera de oídos, llamada también cerumen o cerilla (de *cera*, palabra latina que significa cera), es secretada por las células que cubren el conducto auditivo. Lubrica el conducto y atrapa partículas que podrían dañar al tímpano. La cera de oídos es una mezcla compleja, formada principalmente por ácidos grasos de cadena larga, colesterol y ceramidas. También contiene escualeno, triacilgliceroles y ceras verdaderas (10% del peso).

Los **eicosanoides** son derivados oxigenados de ácidos grasos poliinsaturados de C_{20}, como ácido araquidónico. En la figura 9.18 se presentan algunos ejemplos de eicosanoides. Éstos participan en una diversidad de procesos fisiológicos, y también pueden mediar muchas respuestas potencialmente patológicas. Las **prostaglandinas** son eicosanoides que tienen un anillo de ciclopentano. La prostaglandina E_2 puede causar constricción de vasos sanguíneos, y el tromboxano A_2 interviene en la formación de coágulos sanguíneos, que en algunos casos pueden bloquear el flujo de sangre al

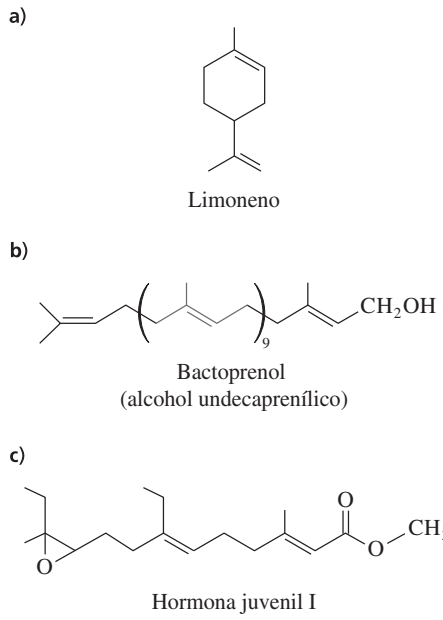
Figura 9.18 ▶
Estructuras de ácido araquidónico **a)** y de tres icosanoides derivados del mismo. El araquidonato es un ácido graso poliinsaturado que tiene cuatro dobles enlaces *cis*.



corazón o al cerebro. El leucotrieno D_4, mediador de la contracción de músculos lisos, también provoca la constricción bronquial de los asmáticos. La aspirina (ácido acetilsalicílico) alivia el dolor, la fiebre, la hinchazón y la inflamación, al inhibir la síntesis de las prostaglandinas.

Algunos de los lípidos no de membrana se relacionan con el isopreno (figura 9.13), pero no son esteroides. En el capítulo 7 ya se analizaron varios de esos lípidos. Las vitaminas lipídicas A, E y K son isoprenoides que contienen largas cadenas de hidrocarburo o anillos fundidos (sección 7.13). La vitamina D es un isoprenoide derivado del colesterol. Hay varios carotenos relacionados con el retinol (vitamina A). La cadena hidrofóbica de la ubiquinona contiene de 6 a 10 unidades de isoprenoide (sección 7.14).

El limoneno (figura 9.19a) es un terpeno, lípido cíclico que principalmente es responsable del olor característico de los limones. Otros isoprenoides son el bactoprenol (alcohol undecaprenílico, figura 9.19b) y la hormona juvenil I (figura 9.19c), que regula la expresión de los genes necesarios para el desarrollo en los insectos. Isoprenoides parecidos al bactoprenol son lípidos importantes en las arqueobacterias, donde sustituyen a los ácidos grasos en la mayor parte de los fosfolípidos de membrana.



◀ Figura 9.19
Algunos isoprenoides.

9.8 Las membranas biológicas están formadas por bicapas lipídicas y proteínas

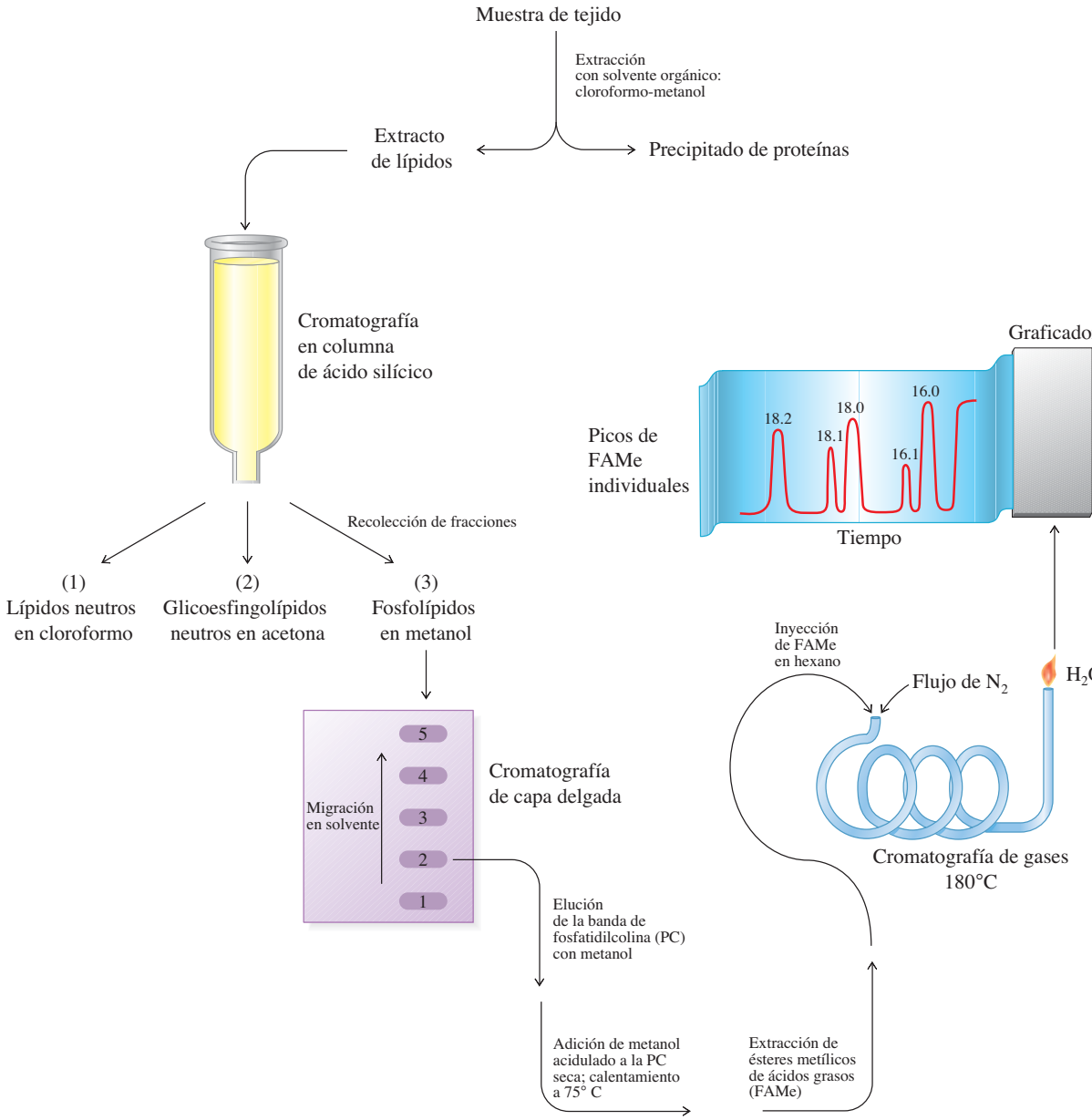
Las membranas biológicas definen los límites externos de las células, y separan compartimientos dentro de ellas. Son componentes esenciales de todas las células vivas. Una membrana típica está formada por dos capas de moléculas de lípidos y muchas proteínas embebidas en ella.

Las membranas biológicas no sólo son barreras pasivas contra la difusión. Tienen una gran variedad de funciones complejas. Algunas proteínas contenidas en las membranas sirven como bombas selectivas que controlan en forma estricta el transporte de iones y de moléculas pequeñas que entran y salen de la célula. Las membranas también son responsables de generar y mantener la concentración de gradientes de protones, esenciales para la producción de ATP. Los receptores en las membranas reconocen señales extracelulares y las comunican al interior de la célula.

RECUADRO 9.3 En el estudio de los lípidos deben usarse técnicas no acuosas especiales

El estudio de los lípidos en el laboratorio es excepcional, porque implica usar solventes orgánicos. A diferencia de los componentes hidrosolubles o hidrofílicos de los tejidos, como carbohidratos y la mayor parte de las proteínas, en general los lípidos tienen muy poca solubilidad en agua. Para analizar los componentes lípidos de los organelos, células o tejidos, debe homogeneizarse o dispersarse la muestra en una solución de solvente orgánico, como metanol o cloroformo. El metanol precipita las proteínas, en tanto que el cloroformo disuelve bien los lípidos de las membranas. La solución de lípidos que resulta puede manipularse más para separar las principales clases de lípidos, y después para separar los diversos componentes dentro de cada clase. Deben evitarse recipientes de plástico, pues muchos plásticos se pueden disolver en cloroformo. Se han "descubierto" varios "lípidos" nuevos después de poner los extractos de cloroformo en tubos de plástico. En la figura de abajo se muestra un esquema de la purificación de los lípidos, que se describirá en los párrafos siguientes.

El ácido silícico, o gel de sílice, es un medio cromatográfico que se parece a la arena de mar blanca y fina. Se usa para purificar



▲ Diagrama de flujo de la extracción y purificación de lípidos. Para separar y analizar las clases de lípidos y los ácidos grasos componentes se usan cromatografía en columna de ácido silícico, cromatografía de capa delgada y cromatografía de gases.

lípidos. Por ejemplo, se puede depositar un extracto de lípidos, preparado a partir de los glóbulos rojos, sobre una columna de ácido silícico equilibrada con cloroformo. Al hacer pasar cloroformo por la columna, se pueden eluir de ella lípidos neutros, como colesterol, triacilgliceroles y diacilgliceroles, quedando los lípidos más polares unidos al ácido silícico. Al cambiar el solvente a acetona, se permite la elución de glicoesfingolípidos neutros, y con la aplicación de metanol se eluyen los fosfolípidos.

Mediante cromatografía de capa delgada se logra una separación más fina de los compuestos en cada uno de estos grupos. En una placa de vidrio se coloca una capa muy delgada (de 0.2 a 0.5 mm) de ácido silícico, y la mezcla de lípidos (por ejemplo, el fosfolípido) se deposita sobre la capa delgada, cerca de la parte inferior de la placa. A continuación se pone la placa verticalmente en un tanque poco profundo y cubierto, que contiene un pequeño volumen de una solución de cloroformo, metanol, agua y ácido acético. El solvente migra lentamente subiendo por la placa y separando los compuestos lípidos menos polares (que se mueven con más rapidez con el solvente) de los compuestos polares, más lentos. De esta forma se separan bandas de fosfolípidos, como esfingomielina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina y otros. Las bandas se pueden localizar exponiendo la placa al vapor de yodo, o rociándola con un colorante fluorescente que haga posible ver las bandas de lípidos bajo luz ultravioleta. Cada banda se puede raspar y separar de la placa, y el fosfolípido se puede eluir del ácido silícico con solvente. Una forma cómoda para cuantificar los fosfolípidos es por hidrólisis en ácido y medición del fosfato inorgánico liberado mediante una determinación sencilla del color.

Por suerte, muchas grasas y sus derivados son volátiles a altas temperaturas. Los ácidos grasos componentes de fosfolípidos que se hayan separado por cromatografía de capa delgada se analizan con una técnica llamada cromatografía de gases. Los fosfolípidos se tratan con metanol acidulado, para producir ésteres metílicos de ácido graso; esta mezcla se inyecta en la parte superior de una columna larga, calentada, que contiene un medio de adsorción sólido. Los ésteres metílicos son arrastrados por un flujo de nitrógeno gaseoso por la columna. Los ácidos grasos más largos, más insaturados, se separan de las cadenas más cortas, que se mueven más rápido. Ya que los lípidos se encienden a altas temperaturas, se pueden detectar los ésteres metílicos con una llama de hidrógeno colocada en el extremo de la columna, que quema cada éster metílico a medida que sale. La combustión se detecta por medios electrónicos y la señal se capta en un registrador, haciendo posible identificar y cuantificar cada pico.

El perfil de ácidos grasos de la figura indica la diversidad de especies moleculares dentro de una clase de fosfolípido. La especie individual de fosfatidilcolina también se puede resolver tratando el fosfolípido con fosfolipasa C para producir los diversos componentes de diacilglicerol. Esos diacilgliceroles se pueden separar con base en la longitud de su cadena y el grado de insaturación de sus ácidos grasos, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, *high-performance liquid chromatography*). En la HPLC, la mezcla de diacilgliceroles se separa por el flujo de solventes a presión a través de una columna. Es común ver entre 20 a 30 especies distintas en una muestra de fosfolípido.

Muchas células tienen membranas con estructuras especializadas. Por ejemplo, numerosas bacterias tienen membranas dobles: una exterior y una membrana plasmática interior. El líquido en el espacio periplásmico entre estas dos membranas contiene proteínas que conducen a solutos específicos hacia proteínas de transporte en la membrana interna. A continuación los solutos atraviesan la membrana interna mediante un proceso dependiente de ATP. Una membrana externa lisa de una mitocondria tiene proteínas que forman canales acuosos; su membrana interna convolucionada (sinuosa) es permeable en forma selectiva, y tiene muchas enzimas unidas a la membrana. El núcleo también tiene una membrana doble; el contenido nuclear interactúa con el citosol a través de poros nucleares. La única membrana del retículo endoplásmico está muy convolucionada. Su extensa red en las células eucariotas interviene en la síntesis de proteínas transmembranales y de proteínas segregadas, así como de lípidos en muchas membranas.

En esta sección se explorará la estructura de las membranas biológicas. En las secciones que restan de este capítulo se describirán las propiedades y las funciones de las membranas biológicas.

A. Bicapas lipídicas

Recuérdese que en la sección 2.4 se dijo que los detergentes en soluciones acuosas pueden formar espontáneamente monocapas o micelas. Igual que los detergentes, los glicerofosfolípidos y los glicoesfingolípidos anfipáticos pueden formar monocapas bajo ciertas condiciones. En las células, esos lípidos no se empacan bien en las micelas, sino más bien tienden a formar **bicapas lipídicas** (figura 9.20). Las bicapas lipídicas son el principal componente estructural de todas las membranas biológicas, incluyendo membranas plasmáticas y membranas internas de células eucariotas. Las interacciones no covalentes

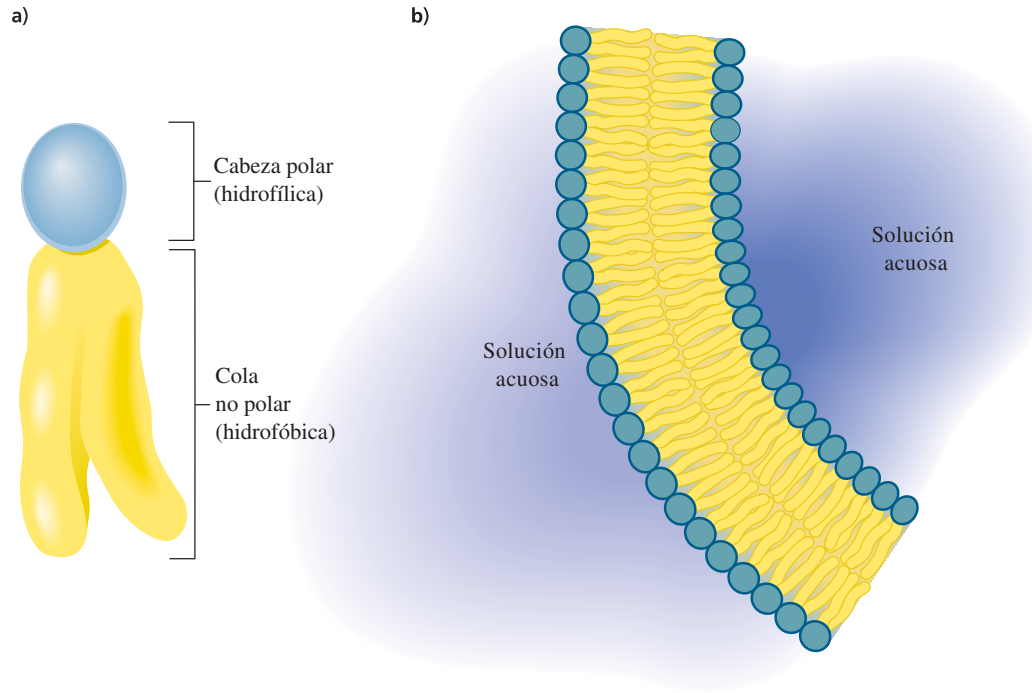


Figura 9.20 ▲
Lípidos y bicapa de membrana. **a)** Un lípido de membrana anfipática. **b)** Corte transversal de una bicapa lipídica . Los grupos hidrofílicos de la cabeza (pequeños círculos) en cada hojilla ven hacia el medio acuoso, y las colas hidrofóbicas (parte central) se agrupan entre sí en el interior de la bicapa.

entre las moléculas de lípidos en las bicapas hacen que las membranas sean flexibles y les permiten autosellarse. Los triacilgliceroles, que son muy hidrofóbicos y no son anfipáticos, no pueden formar bicapas, y el colesterol, aunque es ligeramente anfipático, no forma bicapas por sí mismo.

Una bicapa lipídica tiene en forma típica de 5 a 6 nm de espesor, y consiste en dos hojas o monocapas (que también se llaman hojillas). En cada hoja, los grupos polares de cabeza en los lípidos anfipáticos están en contacto con el medio acuoso, y las colas no polares de hidrocarburos apuntan hacia el interior de la bicapa. La formación espontánea de bicapas lipídicas es impulsada por las interacciones hidrofóbicas (sección 2.5D). Cuando se asocian las moléculas de lípido, la entropía de las moléculas de solvente aumenta y eso favorece la formación de la bicapa lipídica.

B. Modelo fluido de mosaico para membranas biológicas

Una membrana biológica típica contiene de un 25 a un 50% de lípidos, y de un 50 a un 75% de proteínas, en masa, con menos de 10% de carbohidratos como componente de glicolípidos y glicoproteínas. Los lípidos son una mezcla compleja de fosfolípidos, glicoesfingolípidos (en animales) y colesterol (en algunos eucariotas). El colesterol y algunos otros lípidos que por sí no forman bicapas (30% del total) están estabilizados en el arreglo de bicapa por el otro 70% de los lípidos en la membrana. Las composiciones de las membranas biológicas varían en forma considerable entre las especies, y aun entre distintos tipos celulares en organismos multicelulares. Por ejemplo, la membrana de mielina que aísla a las fibras nerviosas contiene relativamente poca proteína. En contraste, la membrana mitocondrial interna es rica en proteínas, lo que refleja su alto nivel de actividad metabólica. La membrana plasmática de los glóbulos rojos también es excepcionalmente rica en proteínas.

Además de tener una relación característica de lípido a proteína, cada membrana biológica tiene una composición característica de lípidos. Por ejemplo, las membranas en el tejido cerebral tienen un contenido relativamente alto de fosfatidilserinas, en tanto

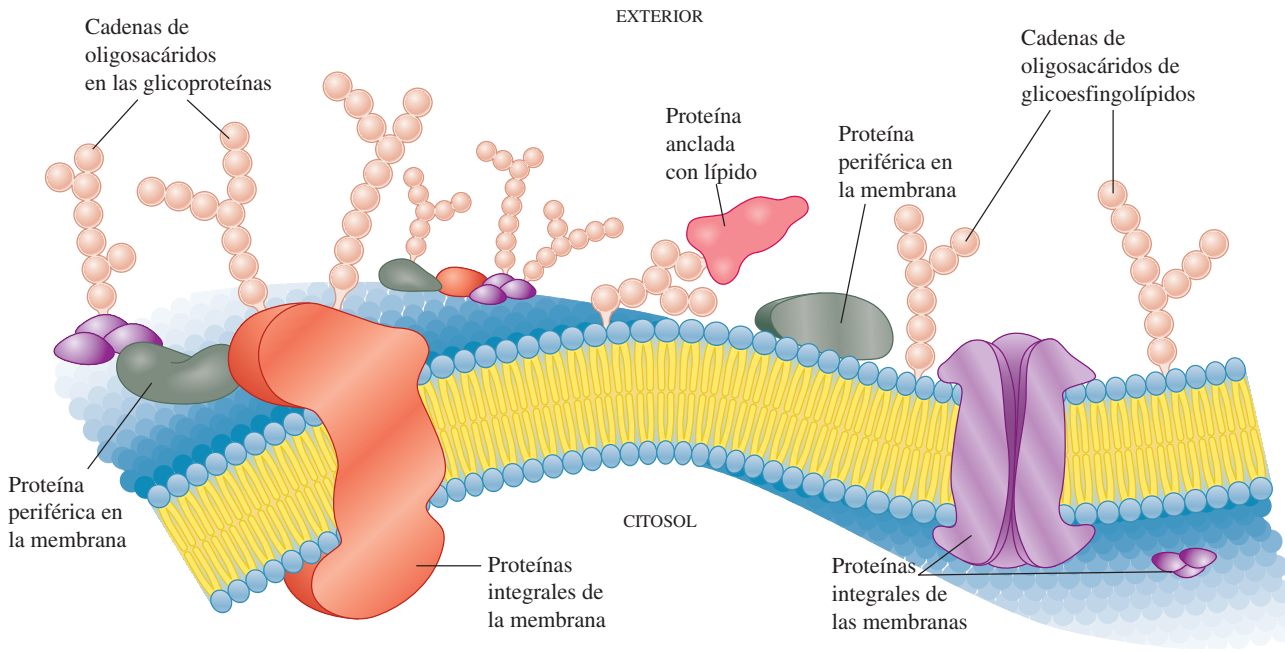


Figura 9.21 ▲
Estructura de una membrana plasmática de eucariota. Una bicapa lipídica forma la matriz básica de las membranas biológicas, y las proteínas (algunas de las cuales son glicoproteínas) se asocian con ella en diversas formas (sección 9.10). Los oligosacáridos de las glicoproteínas y los glicolípidos están en la superficie exterior de la membrana.

que las membranas en el corazón y los pulmones tienen altas concentraciones de fosfatidilglicerol y esfingomielinas, respectivamente. Las fosfatidiletanolaminas forman cerca del 70% de los lípidos de membrana interna en las células de *E. coli*. Las membranas externas de las bacterias gramnegativas contienen lipopolisacáridos.

Además de estar distribuidos en forma diferente entre los diversos tejidos, los fosfolípidos también están distribuidos en forma asimétrica entre las monocapas interna y externa de una sola membrana biológica. Por ejemplo, en las células de mamíferos, el 90% de las moléculas de esfingomielina están en la superficie externa de la membrana plasmática. También la fosfatidilserina está distribuida en forma asimétrica en muchas células, y el 90% de las moléculas se halla en la monocapa citoplásmica.

Una membrana biológica es más gruesa que una bicapa lipídica: en forma típica tiene de 6 a 10 nm de espesor. S. Jonathan Singer y Garth L. Nicolson propusieron en 1972 el **modelo de mosaico fluido** y todavía tiene validez general para describir el arreglo de lípidos y proteínas dentro de una membrana. Según el modelo del mosaico fluido, la membrana es una estructura dinámica en la que se pueden difundir lateralmente o girar dentro de la bicapa, en forma rápida y aleatoria, las proteínas y los lípidos. Las proteínas de membrana se conciben como témpanos de hielo flotando en un mar muy fluido de bicapa lipídica (figura 9.21). (En realidad, algunas proteínas están inmóviles, y algunos lípidos tienen movimientos restringidos).

9.9 Las bicapas lipídicas y las membranas son estructuras dinámicas

Los lípidos en una bicapa están en movimiento constante, dando a las bicapas lipídicas muchas de las propiedades de los fluidos. Los lípidos tienen varios tipos de movimiento molecular dentro de las bicapas. El rápido movimiento de los lípidos dentro del plano de una monocapa es un ejemplo de difusión lateral bidimensional. Una molécula de fosfolípido se puede difundir de un extremo a otro de una célula bacteriana (una distancia

aproximada de 2 μm) en 1 s más o menos a 37 °C. Por consiguiente, una bicapa lipídica puede considerarse como una solución bidimensional.

En contraste, la difusión transversal es el paso de lípidos de una monocapa de la bicapa a la otra. La difusión transversal es mucho más lenta que la lateral (figura 9.22). La cabeza polar de una molécula de fosfolípido está muy solvatada y debe desprenderse de su esfera de solvatación y penetrar al interior del hidrocarburo en la bicapa, para moverse de una hojilla a la otra. La barrera de energía asociada con este movimiento es tan alta, que la difusión transversal de fosfolípidos en una bicapa sucede más o menos a una mil millonésima de la frecuencia de rapidez de la difusión lateral. La muy baja velocidad de difusión transversal de los lípidos de membrana es lo que permite que las capas interna y externa de las membranas biológicas mantengan distintas composiciones de lípidos.

Todas las células sintetizan membranas nuevas agregando lípidos y proteínas a sus membranas existentes. Al extenderse la membrana plasmática, la célula aumenta de tamaño. Al final, la célula se dividirá y cada célula hija heredará una parte (por lo regular la mitad) de las membranas progenitoras. Las membranas internas se extienden y dividen de la misma manera.

En las bacterias, las moléculas de lípidos suelen agregarse al lado citoplásmico de la bicapa lipídica. La asimetría lipídica se genera agregando nuevos lípidos sintetizados de preferencia a una de las monocapas. Como la difusión transversal es tan lenta, esas moléculas recién sintetizadas no se difundirán a la capa externa de la membrana plasmática. Esto explica el enriquecimiento de algunos tipos de lípidos en la capa interna. La asimetría lipídica también puede generarse y conservarse con la actividad de flipasas y flopasas (de *flip-flop diffusion*, o difusión transversal) unidas a la membrana; son enzimas que usan la energía del ATP para mover fosfolípidos específicos de una monocapa a la otra. La actividad de estas enzimas explica el enriquecimiento de ciertos tipos de fosfolípido en la capa externa. Las células eucarióticas fabrican sus lípidos de membrana en una reestructuración asimétrica en el retículo endoplásmico del aparato de Golgi. Los fragmentos de membrana van desde estos organelos, conservando la asimetría, a otras membranas.

En 1970, L. D. Frye y Michael A. Edidin idearon un experimento elegante para probar si las proteínas de membrana se difunden dentro de la bicapa lipídica . Fusionaron células de ratón con células humanas para formar heterocariotes (células híbridas). Usando anticuerpos marcados con fluorescencia roja que se unen en forma específica a ciertas proteínas en las membranas plasmáticas humanas, y anticuerpos marcados con fluorescencia verde que se unen en forma específica a ciertas proteínas en las membranas plasmáticas de ratón, observaron los cambios en la distribución de las proteínas de

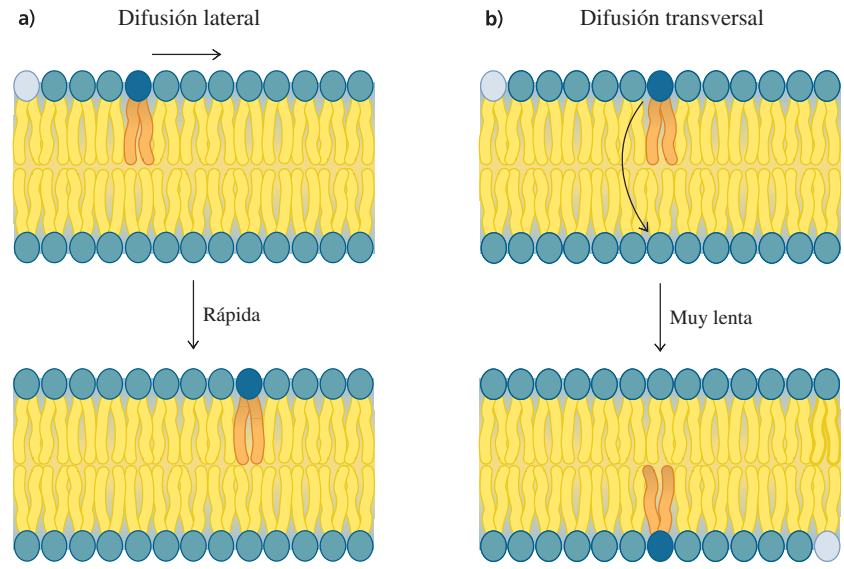


Figura 9.22 ▶
Difusión de lípidos dentro de una bicapa. **a)** La difusión lateral de los lípidos es relativamente rápida. **b)** La difusión transversal, o basculante, de los lípidos, es muy lenta.

membrana al paso del tiempo, con microscopia de inmunofluorescencia. Las proteínas marcadas se entremezclaron dentro de 40 minutos después de la fusión celular (figura 9.23). Este experimento demostró que al menos algunas proteínas de membrana se difunden libremente en las membranas biológicas.

Unas pocas proteínas de membrana se mueven con mucha rapidez dentro del plano de la membrana. Sin embargo, la mayor parte de las proteínas de membrana se difunden unas 100 a 500 veces más lento que los lípidos de membrana. La difusión de algunas proteínas se ve muy restringida por la agregación o fijación al citoesqueleto, justo abajo de la superficie de la membrana. Las proteínas de membrana que están relativamente inmóviles pueden funcionar como cercas o jaulas, y restringen el movimiento de otras proteínas. La difusión limitada de las proteínas de membrana produce parches o dominios de proteína, áreas de la membrana cuya composición es distinta a la de la membrana que la rodea.

La distribución de las proteínas de membrana se puede visualizar por **microscopia electrónica de criofractura**. En esta técnica se congela rápidamente una muestra de membrana, hasta la temperatura de nitrógeno líquido, y a continuación se rompe con una cuchilla. La membrana se divide entre las hojillas de la bicapa lipídica, donde las interacciones intermoleculares son más débiles (figura 9.24a, página siguiente). Se evapora el hielo al vacío y la superficie interna expuesta se recubre a continuación con una película delgada de platino, para obtener una réplica metálica que se examina en un microscopio electrónico. Las membranas que son ricas en proteínas de membrana contienen agujeros y baches que indican la presencia de proteínas. En contraste, las membranas que no contienen proteínas son lisas. La figura 9.24b muestra la superficie "cacariza" de la monocapa interna de una membrana de glóbulo rojo, expuesta al eliminar la capa externa.

Las propiedades fluidas de las bicapas lipídicas dependen de la flexibilidad de sus cadenas de acilo graso. Las cadenas de acilo saturado están totalmente extendidas a bajas temperaturas y forman un conjunto cristalino con máximo contacto de Van der Waals entre las cadenas. Cuando se calienta la bicapa lipídica, sucede una transición de fase análoga a la fusión de un sólido cristalino. Las cadenas de acilo de los lípidos en la fase del cristal líquido que resulta están relativamente desordenadas y mal empacadas. Durante la transición de fase, el espesor de la bicapa disminuye un 15% cuando las colas de hidrocarburo están menos extendidas debido a la rotación en torno a los enlaces C—C (figura 9.25, página siguiente). Las bicapas formadas por un solo tipo de lípido tienen transición de fase a una temperatura definida, llamada temperatura de transición de fase. Cuando los lípidos contienen cadenas de acilo no saturado, el interior hidrofóbico de la bicapa es fluido muy por debajo de la temperatura ambiente (23 °C). Las membranas biológicas, que contienen una mezcla heterogénea de lípidos, cambian en forma gradual de gel a la fase de cristal líquido, en forma típica dentro de un intervalo de temperatura de 10 a 40 °C. Las transiciones de fase en las membranas biológicas pueden ser localizadas, por lo que pueden coexistir regiones de fase fluida y de gel a ciertas temperaturas.

La estructura de un fosfolípido tiene efectos notables sobre su fluidez y su temperatura de transición de fase. Según se vio en la sección 9.2, la cadena de hidrocarburo de un ácido graso con un doble enlace *cis* tiene un doblez, que interrumpe el empacamiento y aumenta la fluidez. Si se incorpora un grupo acilo graso en un fosfolípido disminuye la temperatura de transición de fase. Los cambios de fluidez en la membrana afectan el transporte de membrana y las funciones catalíticas de las proteínas de membrana, por lo que muchos organismos mantienen fluidez de membrana bajo distintas condiciones, ajustando la relación de grupos acilo no saturados y saturados en los lípidos de membrana. Por ejemplo, cuando crecen bacterias en bajas temperaturas, aumenta la proporción de grupos acilo grasos no saturados en las membranas. Los peces de colores se adaptan a la temperatura del agua donde nadan. Cuando baja la temperatura ambiente hay un aumento de ácidos grasos en las membranas intestinales de esos peces, y en todo el cerebro. El menor punto de fusión y la mayor fluidez de los grupos acilo no saturados conservan la fluidez de membrana, y permiten continuar los procesos de membrana a menores temperaturas.

El colesterol forma de un 20 a 25% de la masa de lípidos en una membrana plasmática típica de mamífero, y afecta bastante la fluidez de la membrana. Cuando se intercalan las rígidas moléculas de colesterol entre las cadenas de hidrocarburo de los lípidos de membrana, se restringe la movilidad de las cadenas de acilo graso en la

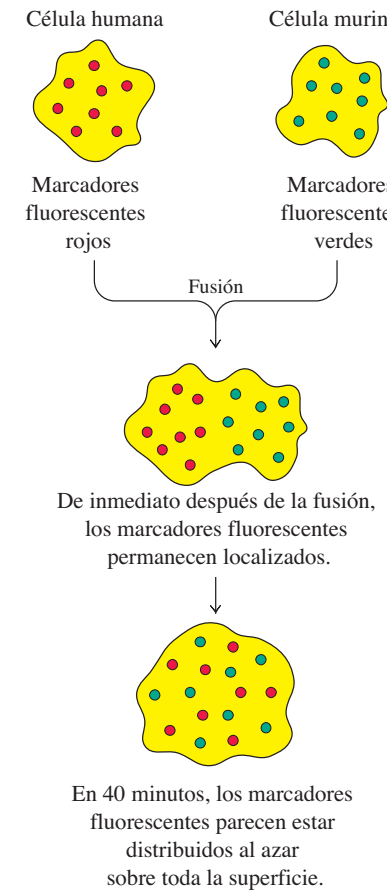


Figura 9.23 ▲
Difusión de proteínas de membrana. Células humanas cuyas proteínas de membrana marcadas con una sustancia fluorescente roja se fundieron con células de ratón, cuyas proteínas de membrana se habían marcado con una sustancia fluorescente verde. Los marcadores, al principio localizados, se dispersaron sobre toda la superficie de la célula fusionada en 40 minutos. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

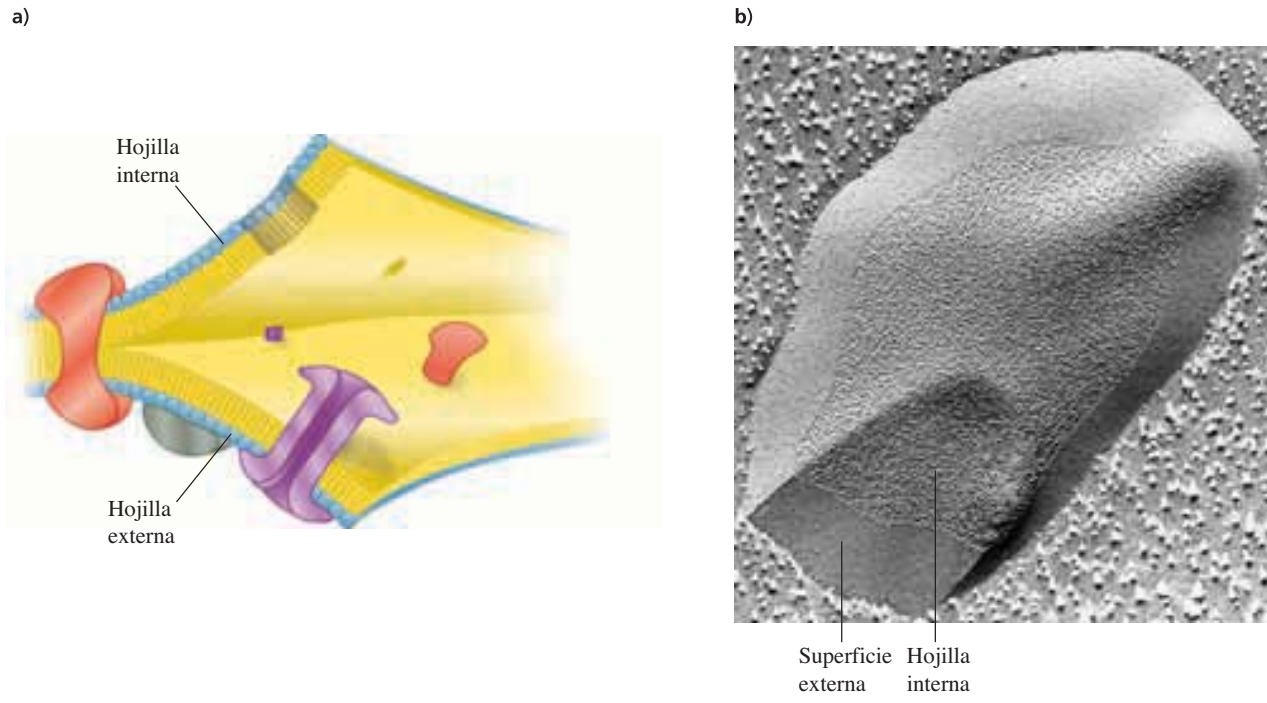


Figura 9.24 ▲
Fractura de una membrana biológica congelada. **a)** Desprendimiento de la bicapa lipídica a lo largo de la interfase de las dos hojillas. Una réplica en platino de la superficie interna expuesta se examina en un microscopio electrónico. Las proteínas de membrana parecen proyecciones o cavidades en la réplica. **b)** Micrografía electrónica de una membrana de eritrocito congelada y fracturada. Los baches en la superficie interna de la membrana indican los lugares de las proteínas de membrana.

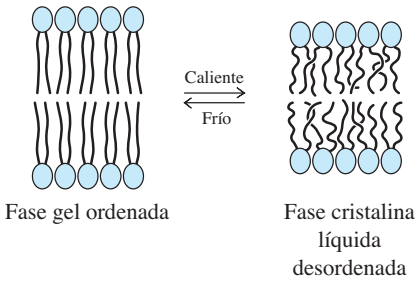


Figura 9.25 ▲
Transición de fase de una bicapa lipídica. En el estado ordenado de gel, las cadenas de hidrocarburo están extendidas. Arriba de la temperatura de transición de fase, la rotación en torno a los enlaces C—C desordena las cadenas en la fase cristalina de líquido.

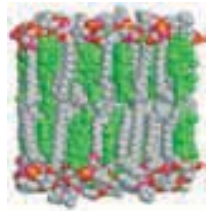


Figura 9.26 ▲
Modelo de una membrana lipídica que contiene moléculas de colesterol y de fosfolípidos. Obsérvese el denso empacamiento del colesterol y las largas cadenas saturadas de los grupos acilo graso. Las moléculas de colesterol se muestran en color verde. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

membrana, y la fluidez disminuye a altas temperaturas (figura 9.26). El colesterol interrumpe el empacamiento ordenado de las cadenas extendidas de acilo graso, y así aumenta la fluidez a bajas temperaturas. El colesterol, en las membranas de células animales, ayuda así a mantener una fluidez bastante constante frente a las fluctuaciones de temperatura o grado de saturación de ácidos grasos.

El colesterol tiende a asociarse con los esfingolípidos, porque tienen largas cadenas de ácido graso saturado. Las cadenas no saturadas de la mayor parte de los glicerofosfolípidos producen arrugas que no admiten con facilidad moléculas de colesterol en la membrana. Debido a esta asociación preferente, las membranas de mamíferos están formadas por parches de regiones de colesterol/esfingolípido, rodeadas por regiones que tienen muy poco colesterol. Esos parches se llaman **balsas de lípido**. Ciertas proteínas de membrana se pueden asociar en forma preferente a las balsas de lípido. Así, algunas proteínas de membrana también pueden tener una distribución de parches sobre la superficie celular. Se cree que las proteínas de membrana tienen un papel importante en la conservación de la integridad de las balsas de lípido.

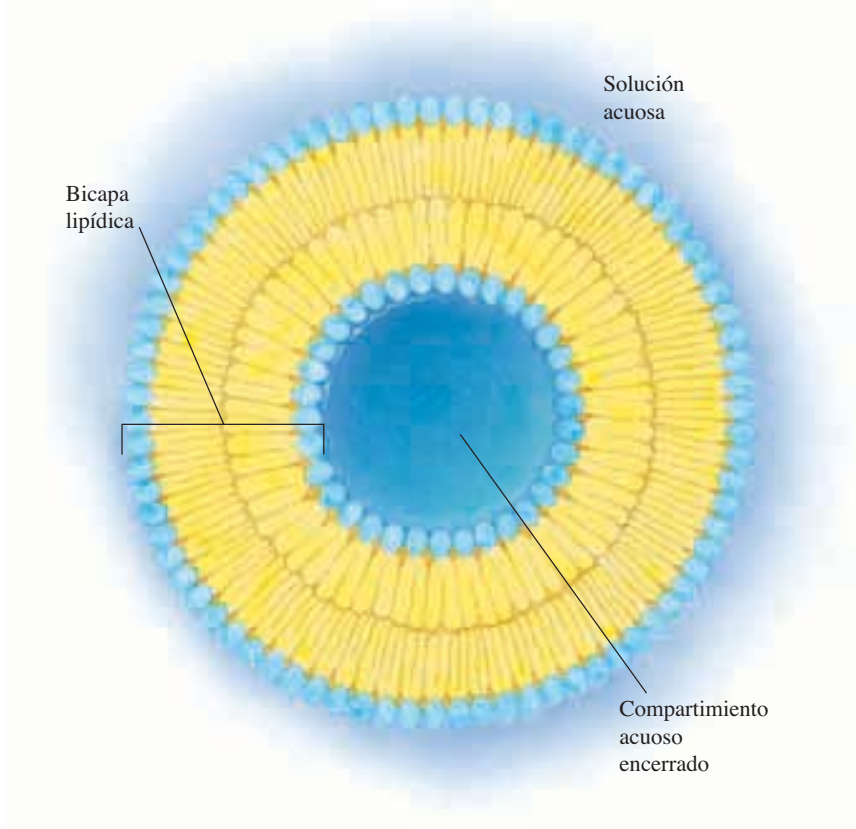
9.10 Tres clases de proteínas de membrana

Las membranas celulares e intracelulares contienen proteínas especializadas enlazadas en la membrana. Esas proteínas se dividen en tres clases, según su modo de asociación con la bicapa lipídica: proteínas integrales de membrana, proteínas periféricas de membrana y proteínas de membrana ancladas a lípidos (figura 9.21).

Las **proteínas integrales de membrana,** llamadas también proteínas transmembranales, contienen regiones hidrofóbicas incrustadas en el interior hidrofóbico de la bicapa lipídica . Las proteínas integrales de membrana abarcan totalmente a la bicapa

RECUADRO 9.4 Nuevas vesículas de lípido o liposomas

Las vesículas sintéticas (llamadas a menudo liposomas) formadas por bicapas de fosfolípido que encierran un compartimiento acuoso se pueden crear en el laboratorio. Para reducir al mínimo un contacto desfavorable entre la orilla hidrofóbica de la bicapa y la solución acuosa, las bicapas lipídicas tienden a cerrarse y formar esas estructuras esféricas. Las vesículas suelen ser bastante estables e impermeables a muchas sustancias. Los liposomas, cuyo compartimiento interior acuoso contiene moléculas de medicamento, se pueden usar para llevar las medicinas a determinados tejidos en el organismo, siempre que en la membrana del liposoma existan proteínas específicas. Las bicapas sintéticas son un método experimental importante en la investigación de las membranas celulares.



▲ Corte transversal esquemático de una vesícula lipídica o liposoma. La bicapa está formada por dos hojillas. En cada una, los grupos de cabeza polar de los lípidos anfipáticos se extienden hacia el medio acuoso, y las colas de hidrocarburo, no polares, se dirigen hacia el interior, y están en contacto por van der Waals entre sí.

con una parte de la proteína expuesta sobre la superficie externa, y una parte expuesta en la superficie interna. Algunas proteínas integrales de membrana están ancladas sólo por una parte de la cadena del polipéptido que abarca la membrana. Otras proteínas de membrana tienen varios segmentos unidos por bucles en la superficie de la membrana. El segmento que abarca la membrana con frecuencia es una α hélice que contiene unos 20 residuos de aminoácidos. A menudo se logra aislar las proteínas integrales de membrana usando un detergente suave, que solubiliza la proteína sustituyendo la mayor parte de los lípidos de membrana. Las proteínas integrales de membrana aisladas se suelen conservar en presencia del detergente, para evitar su desnaturalización.

Una de las proteínas integrales de membrana mejor caracterizadas es la bacteriorrodopsina (figura 9.27). Esta proteína se encuentra en la membrana citoplásmica de la bacteria halofílica (amante de la sal) *Halobacterium halobium*, donde ayuda a controlar

Las funciones de algunas de estas proteínas de membrana se examinarán después, en este capítulo. También se hallarán proteínas de membrana en otros capítulos, como los que describen el transporte de electrones asociado a la membrana (capítulo 14), la fotosíntesis (capítulo 15) y la síntesis de proteínas (capítulo 22).

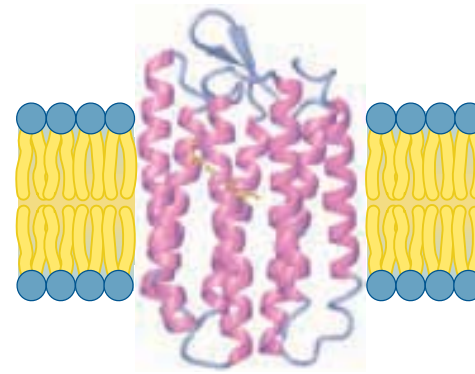


Figura 9.27 ▶
Bacteriorrodopsina de *Halobacterium salinarum*. Siete α hélices que abarcan la membrana, unidas por bucles, forman un haz que abarca la bicapa. El grupo prostético de captación de luz se ve en amarillo. [PDB 1FBB]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

la energía luminosa que se usa en la síntesis del ATP. La bacteriorrodopsina consiste en un haz de siete α hélices. La superficie exterior del haz helicoidal es hidrofóbica e interactúa en forma directa con las moléculas de lípidos en la membrana. La superficie interior contiene cadenas laterales cargadas de aminoácidos que unen a la molécula de pigmento. La bacteriorrodopsina es una de varias proteínas de membrana, α helicoidales, cuyas estructuras se conocen con detalle. En ausencia de datos sobre la estructura tridimensional, con frecuencia se puede predecir la presencia de regiones helicoidales transmembranales de proteínas, al buscar secuencias de aminoácidos que contengan regiones que sean hidrofóbicas (es decir, que tengan altos valores de hidropatía) (sección 3.2G).

La función de la bacteriorrodopsina se describirá en la sección 15.2.

Muchas proteínas integrales de membrana tienen un pliegue de barril β (figura 4.23b). La superficie exterior de las hojas β toca a los lípidos de membrana, y el centro del barril con frecuencia sirve como poro o canal para que pasen moléculas de una cara de la membrana a la otra. La porina de *E. coli*, la FhuA, es un ejemplo típico de esta clase de proteínas integrales de membrana (figura 9.28).

Las **proteínas periféricas de membrana** se asocian a una cara de la membrana, mediante interacciones de carga a carga y con puentes de hidrógeno, con las proteínas integrales de membrana o con los grupos de cabeza polar de los lípidos de membrana. Las proteínas periféricas de membrana se disocian con más facilidad de las membranas, con procedimientos que no requieren romper enlaces covalentes ni romper la membrana misma. Con frecuencia, un cambio de pH o de fuerza iónica basta para eliminar esas proteínas de la membrana.

Las **proteínas de membrana ancladas a lípidos** están unidas a una membrana mediante un enlace covalente con un ancla lipídico. En las proteínas de membrana ancladas a lípidos más simples, una cadena lateral de aminoácidos se une por un enlace de

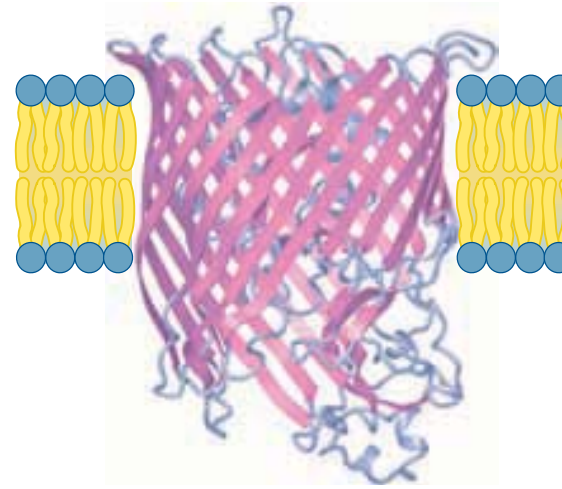


Figura 9.28 ▶
Estructura de cinta de la parte transmembranal de la porina FhuA en *Escherichia coli*. Esta porina forma un canal para el paso de hierro unido a proteína hacia la bacteria. El canal está formado por 22 hojas β antiparalelas. [PDB 1BY3].

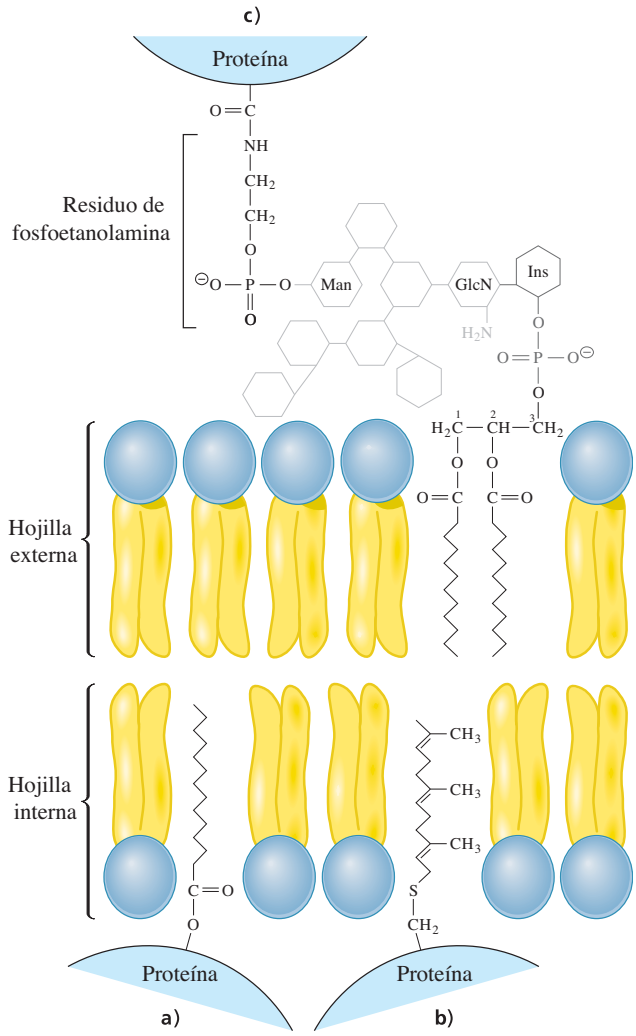
amida o de éster a un grupo de acilo graso, con frecuencia de miristato o palmitato. El ácido graso se inserta en la hojilla citoplásmica de la bicapa y ancla la proteína a la membrana (figura 9.29a). Proteínas de este tipo se encuentran en virus y células eucariotas.

Otras proteínas de membrana ancladas a lípidos están enlazadas en forma covalente a una cadena isoprenoide (de 15 o de 20 carbonos) a través del átomo de azufre de un residuo de cisteína en el término C de la proteína, o cerca de éste (figura 9.29b). Estas **proteínas preniladas** se encuentran en la cara citoplásmica de membranas tanto plasmáticas como intracelulares.

Algunas proteínas decoradas con prenilo se encontrarán en la descripción de la transducción de señales (sección 9.12).

Muchas proteínas eucariotas ancladas a lípidos están unidas a una molécula de glicosilfosfatidilinositol (figura 9.29c). Un glicano de composición diversa se une al inositol por un residuo de glucosamina, un residuo de manosa une al glicano con un residuo de fosfoetanolamina y el grupo α-carboxilo del C terminal en la proteína se enlaza a la etanolamina mediante un enlace de amida. Se sabe que más de 100 proteínas diferentes están asociadas a membranas mediante un ancla de glicosilfosfatidilinositol. Esas proteínas, que tienen diversas funciones, sólo existen en la monocapa externa de la membrana plasmática. Se encuentran en las balsas de colesterol-esfingolípido descritas en la sección 9.9.

Los tres tipos de anclas lipídicas están enlazados en forma covalente a residuos de aminoácidos después de la traducción, esto es, después de que se ha sintetizado la pro-



◀ Figura 9.29
Proteínas de membrana ancladas en lípidos, unidas a la membrana plasmática. Los tres tipos de anclas pueden encontrarse en la misma membrana, pero no forman un complejo como se muestra aquí. **a)** Proteína anclada en un acilo graso. **b)** Proteína de membrana anclada en prenilo. Nótese que las proteínas de membrana ancladas en acilo graso y prenilo también existen en la hojilla citoplásmica (externa) de las membranas intracelulares. **c)** Proteína anclada por glicosilfosfatidilinositol. Aquí se muestra la variante de glicoproteína superficial en *Trypanosoma brucei*, protozoario parásito. La proteína está unida en forma covalente a un residuo de fosfoetanoamina, que a su vez, está unido a una glicana. El glicano (gris claro) incluye un residuo de manosa, al que se fija el residuo de fosfoetanoamina y un residuo de glucosamina, que está fijo al grupo fosfoinositol (gris oscuro) del fosfatidilinositol. Abreviaturas: GlcN = glucosamina; Ins = inositol; Man = manosa.

teína. Igual que las proteínas integrales de membrana, la mayor parte de las ancladas a lípidos están asociadas en forma permanente a la membrana, aunque las proteínas mismas no interactúan con la membrana. Una vez liberadas mediante tratamiento con fosfolipasas, las proteínas se comportan como proteínas solubles.

9.11 Transporte de membrana

Las membranas plasmáticas separan físicamente una célula viva de su ambiente. Además, dentro de las células eucariotas, las membranas rodean a diversos compartimientos, como al núcleo y a las mitocondrias. Las membranas son barreras de permeabilidad selectiva que restringen el paso libre de la mayor parte de las moléculas. Sin embargo, las de agua, oxígeno y otras pequeñas deben poder entrar a todas las células y moverse libremente entre los compartimientos en el interior de las células eucariotas. Las moléculas más grandes, como las de proteínas y ácidos nucleicos, también deben transportarse atravesando las membranas, incluyendo las que hay entre compartimientos. Las moléculas hidrofóbicas y las moléculas pequeñas sin carga pueden difundirse libremente a través de las membranas biológicas, pero el interior hidrofóbico de la bicapa presenta una barrera casi impenetrable frente a la mayor parte de las especies polares o cargadas. Las células vivas mueven a las sustancias polares y iónicas a través de las membranas usando proteínas de transporte (que a veces se les llama portadoras, permeasas o traslocadoras), y transportan macromoléculas por endocitosis o exocitosis.

Los gases no polares, como el O_2 y el CO_2, y las moléculas hidrofóbicas, como las de esteroides, vitaminas lipídicas y algunos medicamentos, entran y salen de la célula difundiéndose a través de la membrana, pasando del lado con mayor concentración al lado de menor concentración. La velocidad del movimiento depende de la diferencia de concentraciones, o gradiente de concentración, entre los dos lados. La difusión gradiente abajo de concentración (es decir, difusión cuesta abajo) es un proceso espontáneo impulsado por aumento de entropía, y por consiguiente disminución de energía libre.

El tráfico de moléculas polares y de iones a través de las membranas es mediado por tres tipos de proteínas integrales de membrana: canales y poros, transportadores pasivos y transportadores activos. Esos sistemas de transporte tienen distintas propiedades cinéticas y necesidades de energía. Por ejemplo, la tasa de movimiento de soluto a través de poros y canales puede aumentar al incrementarse la concentración de soluto, pero la tasa de movimiento mediante transportadores pasivos y activos puede acercarse a un máximo a medida que aumenta la concentración de soluto (es decir, la proteína de transporte se satura). Además, algunos tipos de transporte requieren una fuente de energía. Las características del transporte en la membrana se resumen en la tabla 9.3. En esta sección se describirán los distintos sistemas de transporte en membrana, así como la endocitosis y la exocitosis.

TABLA 9.3 Características de diversos tipos de transporte de membrana

	Portador de proteína	Saturable con sustrato	Movimiento respecto del gradiente de concentración	Energía requerida
Difusión simple	No	No	Hacia abajo	No
Canales y poros	Sí	No	Hacia abajo	No
Transporte pasivo	Sí	Sí	Hacia abajo	No
Transporte activo				
Primario	Sí	Sí	Hacia arriba	Sí (fuente directa)
Secundario	Sí	Sí	Hacia arriba	Sí (gradiente iónico)

A. Termodinámica del transporte en la membrana

Recuérdese, del capítulo 1 (sección 1.4C) que el cambio real de energía libre de Gibbs en una reacción se relaciona con el cambio de energía libre de Gibbs estándar mediante la ecuación

$$\Delta G_{\text{reacción}} = \Delta G^{\circ\prime}{}_{\text{reacción}} + RT \ln \frac{[\text{C}][\text{D}]}{[\text{A}][\text{B}]} \qquad \textbf{(9.1)}$$

donde $\Delta G^{\circ\prime}{}_{\text{reacción}}$ representa el cambio de energía libre de Gibbs estándar para la reacción, [C] y [D] representan las concentraciones de los productos y [A] y [B] representan la concentración de los reactivos. En un proceso de transporte no se rompen ni se forman enlaces químicos, por lo que el cambio de energía libre de Gibbs estándar es cero ($\Delta G^{\circ\prime} = 0$). El cambio de energía libre de Gibbs asociado al transporte en la membrana sólo depende de las concentraciones de las moléculas a cada lado de la membrana.

Para una molécula A, la concentración en el interior de la membrana es $[\text{A}_{\text{int}}]$ y la concentración en el exterior es $[\text{A}_{\text{ext}}]$. El cambio de energía libre de Gibbs asociado al transporte de moléculas de A es

$$\Delta G_{\text{transporte}} = RT \ln \frac{[\text{A}_{\text{int}}]}{[\text{A}_{\text{ext}}]} = 2.303\, RT \log \frac{[\text{A}_{\text{int}}]}{[\text{A}_{\text{ext}}]} \qquad \textbf{(9.2)}$$

Si la concentración de A en el interior de la célula es mucho menor que fuera de la célula, entonces $\Delta G_{\text{transporte}}$ será negativa y se favorecerá termodinámicamente la entrada de A a la célula. Por ejemplo, si $[\text{A}_{\text{int}}] = 1$ mM y $[\text{A}_{\text{ext}}] = 100$ mM, entonces, a 25 °C,

$$\Delta G_{\text{transporte}} = 2.303\, RT \log \frac{[\text{A}_{\text{int}}]}{[\text{A}_{\text{ext}}]} = 2.303 \times 8.325 \times 298 \times (-2)$$
$$= -11.4 \text{ kJ mol}^{-1} \qquad \textbf{(9.3)}$$

Bajo estas condiciones, las moléculas del soluto A tenderán a entrar a la célula para reducir el gradiente de concentración. El flujo en dirección contraria es desfavorable termodinámicamente, ya que se asocia a un cambio positivo de energía libre de Gibbs ($\Delta G_{\text{transporte}} = +11.4$ kJ mol^{-1} para moléculas que pasan del interior de la célula hacia el exterior).

La ecuación 9.2 sólo se aplica a moléculas sin carga. En el caso de las moléculas polares, el cambio de energía libre de Gibbs debe incluir un factor que tenga en cuenta la diferencia de carga a través de una membrana biológica. La mayor parte de las células exportan cationes en forma selectiva, de modo que el interior de una célula tiene carga negativa con respecto al exterior. La diferencia de cargas a través de la membrana es

$$\Delta\Psi = \Delta\Psi_{\text{int}} - \Psi_{\text{ext}} \qquad \textbf{(9.4)}$$

donde $\Delta\Psi$ es el llamado potencial de membrana (en volts). El cambio de energía libre de Gibbs debido a este potencial eléctrico es

$$\Delta G = z\mathcal{F}\Delta\Psi \qquad \textbf{(9.5)}$$

donde z es la carga de la molécula que se esté transportando (por ejemplo +1, –1, +2, –2, etc.) y $\mathcal{F}$ es la constante de Faraday (96485 JV^{-1} mol^{-1}). Ya que el interior de la célula tiene carga negativa, la importación de cationes como $Na^{\oplus}$ y $K^{\oplus}$ es favorecida termodinámicamente por el potencial de membrana. La exportación de cationes debe acoplarse a una reacción productora de energía, ya que se asocia a un cambio positivo de energía libre de Gibbs.

Para cualquier proceso de transporte donde intervienen moléculas con carga, deben tenerse en cuenta los efectos químicos (concentración) y eléctricos (carga). Entonces,

$$\Delta G_{\text{transporte}} = 2.303\ RT\ \log\frac{[\text{A}_{\text{int}}]}{[\text{A}_{\text{ext}}]} + z\mathcal{F}\Delta\Psi \qquad \textbf{(9.6)}$$

B. Poros y canales

Los **poros** y los **canales** son proteínas transmembranales con un paso central para iones y moléculas pequeñas. (En general, el término *poro* se usa en las bacterias, y *canal* para los animales). Los solutos con tamaño, carga y estructura molecular adecuados pueden atravesar rápidamente el pasaje en cualquier dirección, difundiéndose a favor de un gradiente de concentración (figura 9.30). En este proceso no se requiere energía. En general, la tasa de movimiento de soluto a través de un poro o un canal no es saturable a altas concentraciones. Para algunos canales, la tasa puede acercarse al límite controlado por difusión.

Las membranas externas de algunas bacterias son ricas en porinas, una familia de proteínas de poro que permiten que los iones y muchas moléculas pequeñas tengan acceso a transportadores específicos en la membrana plasmática. Se encuentran canales similares en las membranas externas de las mitocondrias. Las porinas sólo son ligeramente selectivas de soluto; funcionan como cribas que están abiertas en forma permanente. En contraste, las membranas plasmáticas de las células animales contienen muchas proteínas de canal que son muy específicas para ciertos iones. Algunos de esos canales siempre están abiertos, en tanto que otros se abren o se cierran sólo como respuesta a una señal específica.

Las membranas de los tejidos nerviosos tienen canales de potasio con compuerta (es decir, controlados), que en forma selectiva permiten el transporte de iones potasio hacia el exterior. Estos canales permiten que los iones $K^{\oplus}$ atraviesen la membrana al menos 10 000 veces más rápido que los iones $Na^{\oplus}$, que son más pequeños. Con estudios cristalográficos se ha demostrado que el canal de potasio tiene una entrada amplia (como un embudo). Los cationes hidratados son dirigidos hidrostáticamente hacia una contracción eléctricamente neutra del poro, llamada filtro de selectividad. Los iones potasio pierden con rapidez algo de su agua de hidratación, y atraviesan el filtro de selectividad. Al parecer, los iones sodio conservan más agua de hidratación y por consiguiente transitan con mucha más lentitud por el filtro. El resto del canal tiene un recubrimiento hidrofóbico. De acuerdo con las composiciones de secuencias de aminoácido, las propiedades estructurales generales del canal de potasio parecen aplicarse también a otros tipos de canales y poros.

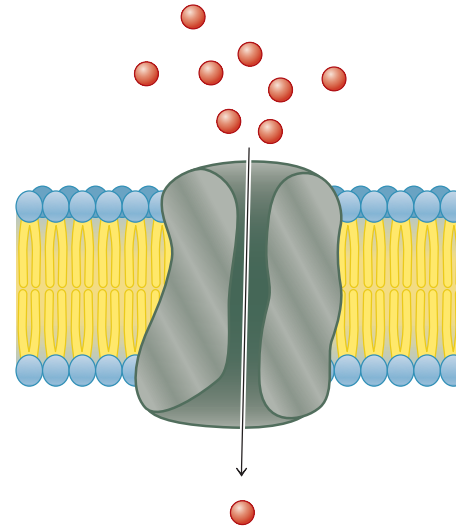


Figura 9.30 ▶
Transporte de membrana a través de un poro o un canal. Un pasaje central permite que las moléculas y iones del tamaño, carga y geometría adecuados atraviesen la membrana en cualquier dirección.

C. Transporte pasivo

Las proteínas de transporte pasivo y activo se unen en forma específica a solutos, y los transportan a través de las membranas. En el transporte pasivo, el soluto se mueve a favor de su gradiente de concentración, y el potencial de membrana es favorable. Entonces, el cambio de energía libre de Gibbs para el transporte es negativo, y el transporte de un lado a otro de la membrana es un proceso espontáneo. En el transporte activo, el soluto se mueve contra un gradiente de concentración, contra una diferencia de carga, o ambas cosas. El transporte activo debe acoplarse a una reacción productora de energía para contrarrestar el cambio desfavorable de energía libre de Gibbs, para transporte sin ayuda. Los transportadores de membrana más simples, sean activos o pasivos, realizan **uniporte**; esto es, sólo llevan un solo tipo de soluto a través de la membrana (figura 9.31a). Muchos transportadores hacen el transporte simultáneo de dos moléculas de diferentes solutos. Si ambas moléculas se transportan en la misma dirección, el proceso se llama **simporte** (figura 9.31b). Si se transportan en direcciones opuestas, el proceso es **antiporte** (figura 9.31c).

El **transporte pasivo** también se llama difusión facilitada, porque no requiere fuente de energía. La proteína de transporte acelera el movimiento del soluto a favor de su gradiente de concentración, proceso que sucedería con mucha lentitud sólo por difusión. En este caso, las proteínas de transporte son parecidas a las enzimas, porque aumentan la velocidad de un proceso que es termodinámicamente favorable. Para un sistema uniporte sencillo, la velocidad inicial de transporte de entrada, como la velocidad inicial de una reacción catalizada por enzima, depende de la concentración externa del sustrato. La ecuación que describe esta dependencia se parece a la ecuación de Michaelis-Menten para catálisis enzimática (ecuación 5.13).

$$v_0 = \frac{V_{máx}[S]_{ext}}{K_{tr} + [S]_{ext}} \qquad \textbf{(9.7)}$$

donde v_0 es la velocidad inicial del transporte hacia adentro, del sustrato a una concentración externa $[S_{ext}]$, $V_{máx}$ es la velocidad máxima de transporte del sustrato y K_{tr} es una constante análoga a la constante de Michaelis (K_m) (es decir, K_{tr} es la concentración de sustrato a la cual el transportador está a la mitad de la saturación). Cuanto menor sea el valor de K_{tr}, la afinidad del transportador hacia el sustrato será mayor. La velocidad de transporte es saturable y se acerca a un valor máximo a alta concentración de sustrato (figura 9.32).

A medida que se acumula sustrato dentro de la célula, aumenta la velocidad del transporte hacia afuera hasta que es igual a la del transporte hacia adentro, y $[S_{int}]$ es igual a $[S_{ext}]$. En este momento, no hay cambio neto en la concentración de sustrato en ambos lados de la membrana, aunque el sustrato continúa atravesando la membrana en ambas direcciones.

Los transportadores pasivos y activos funcionan en forma algo parecida a las enzimas, pero en vez de catalizar un cambio químico en el sustrato, lo mueven de un lado a otro de la membrana. Los modelos de operación de proteínas de transporte parecen indicar que un transportador sufre un cambio conformacional después de unirse a su sustrato. Este cambio conformacional permite liberar al sustrato en el otro lado de la membrana; entonces, el transportador se regresa a su estado original (figura 9.33, página siguiente). El cambio conformacional en el transportador suele ser disparado por el enlazamiento de la especie transportada, como en el ajuste inducido de ciertas enzimas con sus sustratos (sección 6.5C). En el transporte activo, el cambio conformacional puede estar impulsado por ATP u otras fuentes de energía. Igual que las enzimas, las proteínas transportadoras pueden ser susceptibles a inhibición reversible e irreversible.

D. Transporte activo

El **transporte activo** se parece al transporte pasivo en el mecanismo y propiedades cinéticas generales. Sin embargo, el transporte activo requiere energía para mover un soluto contra su gradiente de concentración. En algunos casos, el transporte activo de moléculas o iones cargados causa también un gradiente de carga a través de la membrana, y el transporte activo mueve los iones contra el potencial de membrana.

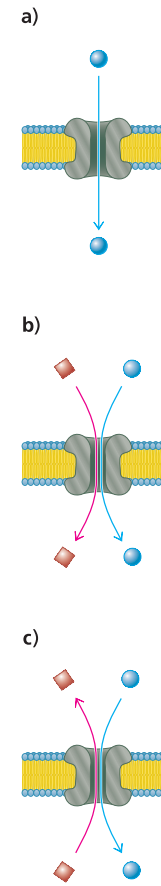


Figura 9.31 ▲
Tipos de transporte activo y pasivo. Aunque las proteínas de transporte se representan con un poro central abierto, las transportadoras pasivas y activas en realidad tienen cambios conformacionales al transportar sus solutos (figura 9.33). **a)** Uniporte. **b)** Simporte. **c)** Antiporte

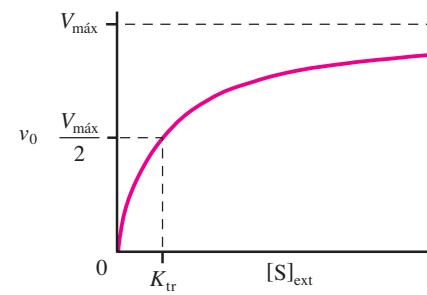


Figura 9.32 ▲
Cinética del transporte pasivo. La velocidad inicial de transporte aumenta con la concentración del sustrato, hasta que se alcanza un máximo. K_{tr} es la concentración del sustrato a la cual la velocidad de transporte es la mitad de la máxima.

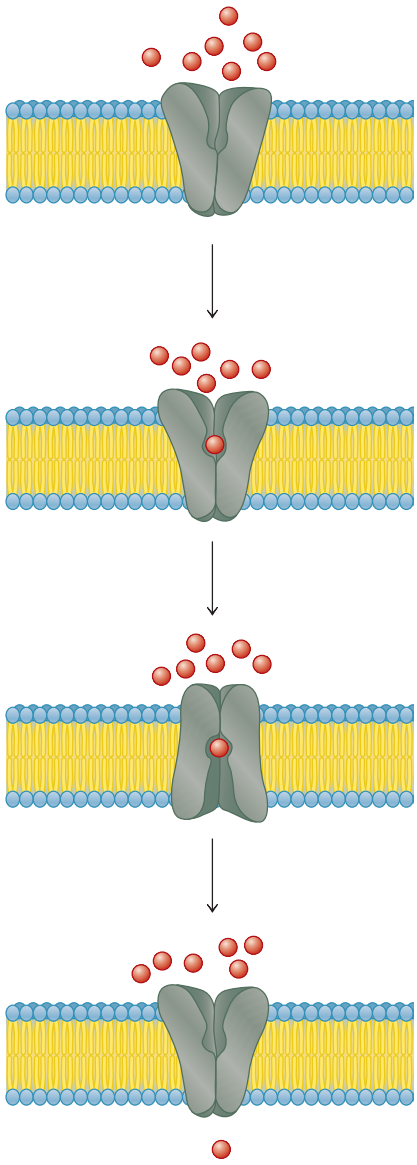


Figura 9.33 ▲
Función de las proteínas de transporte activo y pasivo. La proteína enlaza su sustrato específico, y a continuación sufre un cambio conformacional que permite que la molécula o ion sea liberado en el otro lado de la membrana. Las cotransportadoras tienen sitios específicos de unión para cada especie transportada.

Los transportadores activos usan diversas fuentes de energía, con más frecuencia ATP. Las ATPasas transportadoras de iones se encuentran en todos los organismos. Estos transportadores activos, que incluyen la $Na^{\oplus}$–$K^{\oplus}$ ATPasa y $Ca^{2\oplus}$ ATPasa, crean y mantienen gradientes de concentración de iones a través de la membrana plasmática, y a través de las membranas de los organelos internos.

El **transporte activo primario** está activado por una fuente directa de energía, como ATP o luz. Por ejemplo, la bacteriorrodopsina (figura 9.27) usa energía luminosa para generar un gradiente de concentración de protones a través de la membrana, que se puede usar para formación de ATP. Una proteína de transporte activo primario es la P-glicoproteína, que parece tener un papel principal en la resistencia de las células tumorales a varios medicamentos de quimioterapia. La resistencia a varios medicamentos es una de las causas principales de falla en el tratamiento clínico de cánceres humanos. La P-glicoproteína es una glicoproteína integral de membrana (M_r = 170 000) abundante en la membrana plasmática de las células resistentes al medicamento. Al usar ATP como fuente de energía, la P-glicoproteína bombea una gran variedad de compuestos sin relación estructural no polar, como medicamentos, hacia afuera de la célula, contra un gradiente de concentración. De esta forma se mantiene la concentración citosólica del medicamento en un valor lo suficientemente bajo como para evitar la muerte de la célula. La función fisiológica normal de la P-glicoproteína al parecer es la eliminación de compuestos hidrofóbicos tóxicos en la dieta.

El **transporte activo secundario** está impulsado por un gradiente de concentración. El transporte cuesta arriba activo de un soluto se acopla con el transporte cuesta abajo de un segundo soluto que estaba concentrado por el transporte activo primario. Por ejemplo, en *E coli*, el flujo de electrones a través de una serie de enzimas de oxidación-reducción, unidas a la membrana, genera una mayor concentración extracelular de protones. A medida que regresan los protones al interior de la célula favorecidos por su gradiente de concentración, también la lactosa es transportada al interior de la célula, contra su gradiente de concentración (figura 9.34). La energía del gradiente de concentración de protones impulsa el transporte activo secundario de la lactosa. El simporte de $H^{\oplus}$ y de la lactosa está mediado por la proteína transmembranal lactosa permeasa.

En animales multicelulares grandes, el transporte activo secundario a menudo es activado mediante un gradiente de ion sodio. La mayor parte de las células mantienen una concentración intracelular de ion potasio de 140 mM, aproximadamente, en presencia de una concentración extracelular alrededor de 5 mM. La concentración citosólica de los iones de sodio se conserva entre 5 y 15 mM en presencia de una concentración extracelular aproximada de 145 mM. Estos gradientes de concentración de iones se mantienen con la $Na^{\oplus}$–$K^{\oplus}$ ATPasa, un sistema de transporte antiporte que bombea dos $K^{\oplus}$ hacia la célula y expulsa tres $Na^{\oplus}$ por cada molécula de ATP hidrolizada (figura 9.35). Cada $Na^{\oplus}$–$K^{\oplus}$ ATPasa puede catalizar la hidrólisis de unas 100 moléculas de ATP por minuto, una parte importante (hasta un tercio) del consumo total de energía de una célula animal típica. El gradiente de $Na^{\oplus}$ que se genera por la $Na^{\oplus}$–$K^{\oplus}$ ATPasa es la fuente principal de energía para el transporte activo secundario de glucosa en las células intestinales. Una molécula

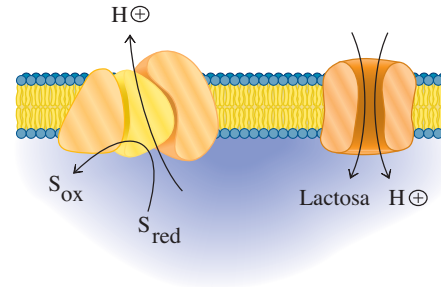
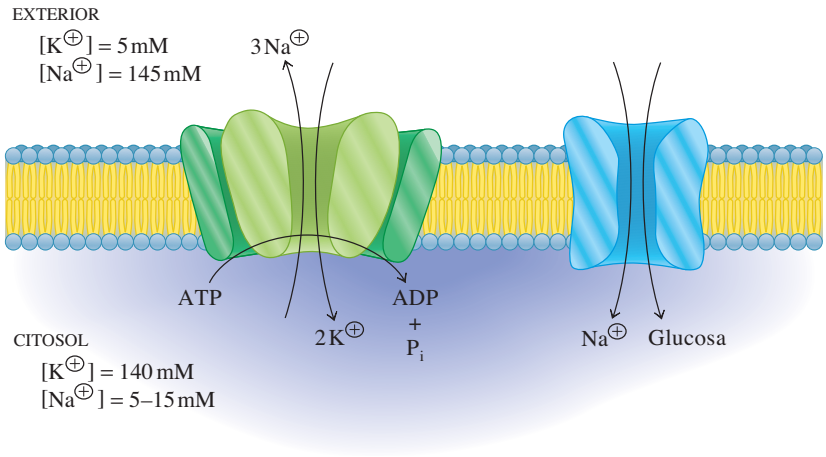


Figura 9.34 ▲
Transporte activo secundario en *Escherichia coli*. La oxidación de sustratos reducidos (S_{red}) genera un gradiente de concentración de protones a través de la membrana (*trasmembrana*). La energía liberada por los protones que bajan por su gradiente de concentración impulsa el transporte de la lactosa hacia el interior de la célula, por la lactosa permeasa.



◀ Figura 9.35
Transporte activo secundario en animales. La $Na^{\oplus}$–$K^{\oplus}$ ATPasa genera un gradiente de ion sodio que impulsa el transporte activo secundario de glucosa en las células intestinales.

de glucosa se importa con cada ion sodio que entra a la célula. La energía liberada por el movimiento de $Na^{\oplus}$ cuesta abajo impulsa el transporte de la glucosa cuesta arriba.

E. Endocitosis y exocitosis

El transporte descrito hasta ahora sucede por el flujo de moléculas o iones a través de una membrana intacta. Las células también necesitan importar y exportar moléculas demasiado grandes como para ser transportadas a través de poros, canales o proteínas de transporte. Los procariotas poseen sistemas especializados de exportación, de varios componentes, en su plasma y membrana externa, que les permite secretar ciertas proteínas (con frecuencia toxinas o enzimas) hacia el medio extracelular. En las células eucariotas, aunque no en todas, las proteínas (y ciertas sustancias grandes) se mueven hacia adentro y afuera de la célula por **endocitosis** y **exocitosis**, respectivamente. En ambos casos, el transporte implica la formación de un tipo especializado de vesícula lipídica.

La endocitosis es el proceso mediante el cual las macromoléculas son rodeadas por la membrana plasmática, y son llevadas al interior de la célula dentro de una vesícula lipídica. La endocitosis mediada por receptor comienza con la unión de macromoléculas a proteínas receptoras específicas en la membrana plasmática de la célula. A continuación, la membrana se invagina y forma una vesícula que contiene las moléculas enlazadas. Como

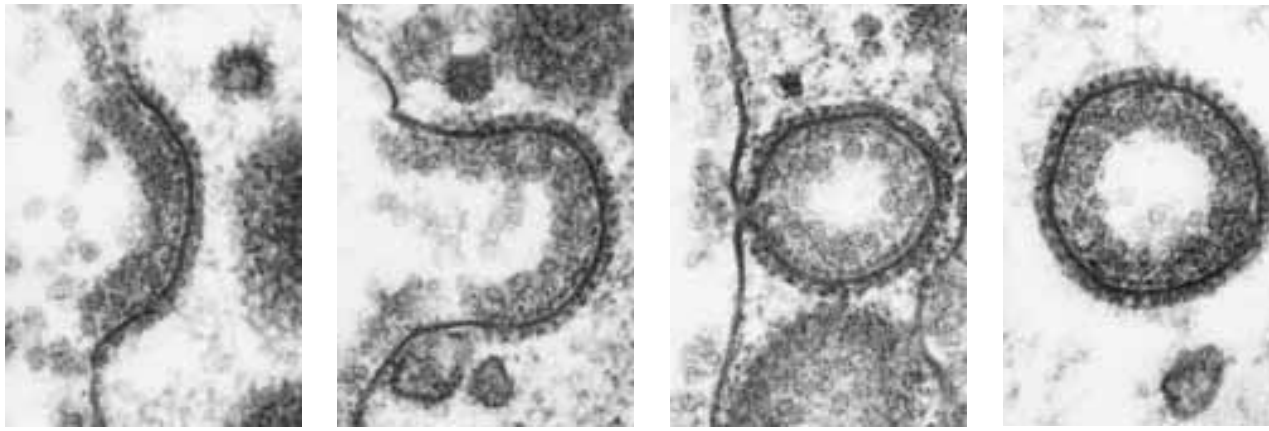
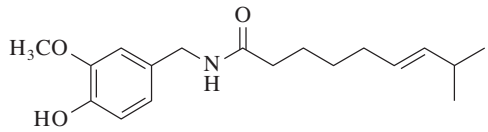


Figura 9.36 ▲
Micrografías electrónicas de endocitosis. La endocitosis comienza con la unión de macromoléculas a la membrana plasmática de la célula. A continuación la membrana se invagina y forma una vesícula que contiene las moléculas enlazadas. El interior de la vesícula es topológicamente equivalente al exterior de la célula.

RECUADRO 9.5 Lo picante de los chiles

Hoy se sabe por qué el sabor de los "picantes" es así y causa un dolor quemante. El factor activo en los pimientos capsicum es un compuesto vainilloide lipofílico llamado capsaicina.



Capsaicina

Se ha identificado y caracterizado una proteína receptora de células nerviosas que responde a la capsaicina. Es un canal de iones, y su secuencia de aminoácidos parece indicar que tiene tres dominios transmembranales. La activación del receptor por capsaicina hace que el canal se abra, para que puedan pasar los iones de calcio y sodio a la célula nerviosa, y mandar un impulso al cerebro. El receptor no sólo se activa por especies vainilloides, sino también por rápidos aumentos de temperatura. De hecho, el papel *in vivo* probable del receptor es la detección de calor. Aunque la acción de los opioides suprime el dolor, la de los vainilloides produce dolor. El control del receptor de capsaicina puede ser valioso en el alivio del dolor crónico, en condiciones como la artritis.

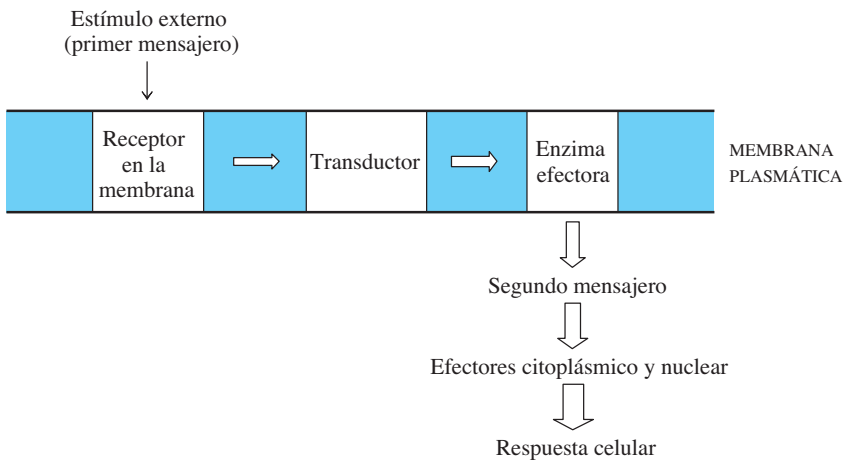
se ve en la figura 9.36, el interior de esa vesícula de membrana equivale al exterior de una célula; así, las sustancias en el interior de la vesícula en realidad no han cruzado la membrana plasmática. Una vez dentro de la célula, la vesícula se puede fundir con un endosoma (otro tipo de vesícula) y después con un lisosoma. Dentro de un lisosoma, el material endocitosado y el receptor mismo se pueden degradar. También, el ligando, el receptor o ambos se pueden reciclar del endosoma y regresar a la membrana plasmática.

La exocitosis se parece a la endocitosis, pero la dirección del transporte es la inversa. Durante la exocitosis, los materiales destinados a ser secretados de la célula se encierran en vesículas mediante el aparato de Golgi (sección 1.8B). A continuación las vesículas se funden con la membrana plasmática y liberan su contenido al espacio extracelular. Los zimógenos de las enzimas digestivas se exportan desde las células pancreáticas de esta manera (sección 6.7A).

9.12 Transducción de señales extracelulares

Las membranas plasmáticas de todas las células contienen receptores específicos que permiten que la célula responda a estímulos químicos externos que no pueden cruzar la membrana. Por ejemplo, las bacterias pueden detectar ciertas sustancias en su ambiente. Una señal pasa a través del receptor en la superficie celular hacia los flagelos, haciendo que la bacteria se mueva hacia una fuente potencial de alimento. A esto se llama **quimiotaxia** positiva. En la quimiotaxia negativa, las bacterias se alejan de las sustancias tóxicas.

En los organismos multicelulares, las células especializadas son las que producen estímulos, como **hormonas** (moléculas que permiten que las células en una parte de un organismo se comuniquen con las de otra parte del mismo organismo), **neurotransmisores** (sustancias que transmiten mensajes nerviosos en las sinapsis) y **factores de crecimiento** (proteínas que regulan la proliferación celular). Estos ligandos pueden viajar hacia otros tejidos, donde se unen a los receptores adecuados en sus superficies y producen respuestas específicas en las células. En esta sección se verá cómo la unión de ligandos hidrosolubles a receptores activa las respuestas intracelulares en los mamíferos. En estas rutas de transducción (es decir, conversión) de señal intervienen adenilil ciclasa, inositol-fosfolípidos y receptores de tirosina cinasas .



◀ Figura 9.37
Mecanismo general de la transducción de señal a través de la membrana plasmática de una célula.

En la figura 9.37 se muestra un mecanismo general de transducción de señal. Un ligando (que también se llama primer mensajero) se une a su receptor específico en la superficie de la célula de destino. Esta interacción genera una señal que pasa a través de un **transductor** de proteína de membrana hasta una **enzima efectora** enlazada a la membrana. La acción de la enzima efectora genera un **segundo mensajero** intracelular, que suele ser una molécula o ion pequeño. El segundo mensajero se puede difundir y conduce la señal hacia su destino final, que puede estar en el núcleo, en un compartimiento intracelular o en el citosol. El enlazamiento de ligando a un receptor en la superficie celular trae como consecuencia casi invariable la activación de proteínas cinasas. Estas enzimas catalizan la transferencia de un grupo fosforilo del ATP a diversas proteínas sustrato, muchas de las cuales ayudan a regular el metabolismo, el crecimiento celular y la división celular. Algunas proteínas están activadas por fosforilación, en tanto que otras están inactivadas. Existe una inmensa diversidad de ligandos, receptores y transductores, pero se conocen muy pocos segundos mensajeros y tipos de enzimas efectoras.

Las cinasas se introdujeron en la sección 5.10D.

Los receptores de tirosina cinasas tienen un mecanismo más simple para la transducción de señales. Con esas enzimas, se combinan en una sola enzima las enzimas de receptor de membrana, transductor y efector. Un dominio receptor, en la cara extracelular de la membrana, está conectado al sitio activo citosólico mediante un segmento transmembranal. El sitio activo cataliza la fosforilación en sus proteínas de destino.

La amplificación es una propiedad importante de las rutas de señalización. Un solo complejo ligando-receptor puede interactuar con varias moléculas de transductor, y cada una de ellas puede activar varias moléculas de enzima efectora. De igual modo, la producción de muchas moléculas de segundo mensajero puede activar a muchas moléculas de cinasa, que catalizan la fosforilación de muchas proteínas. Esta serie de eventos de amplificación se llama **cascada**. El mecanismo de cascada quiere decir que pequeñas cantidades de un compuesto extracelular pueden afectar a grandes cantidades de enzimas intracelulares, sin cruzar la membrana plasmática ni unirse a cada proteína.

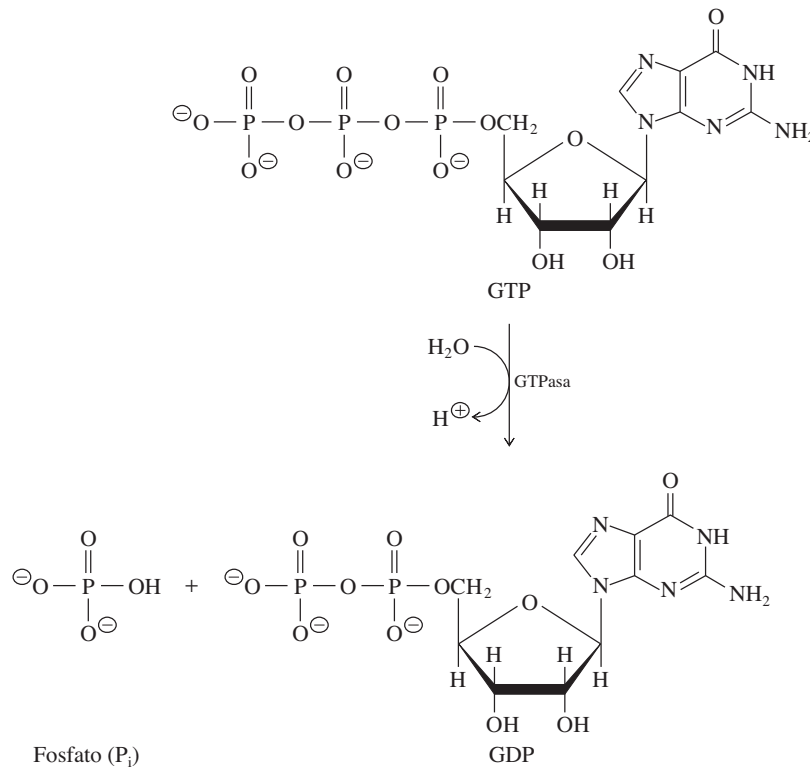
No todos los estímulos químicos se apegan al mecanismo general de transducción de señales que muestra la figura 9.37. Por ejemplo, como las hormonas esteroides son hidrofóbicas, pueden difundirse y atravesar la membrana plasmática hacia el interior de la célula, donde se pueden unir a proteínas receptoras específicas en el citoplasma. Los complejos de esteroide y receptor son transferidos entonces al núcleo. Los complejos se unen a regiones específicas de ADN, llamadas elementos de respuesta hormonal, y con ello amplifican o suprimen la expresión de los genes adyacentes.

Las acciones de las hormonas insulina, glucagón y epinefrina, y la función de las rutas de señalización transmembranal en la regulación del metabolismo de carbohidratos y lípidos se describen en los capítulos 11, 12 y 16.

A. Las proteínas G son transductores de señal

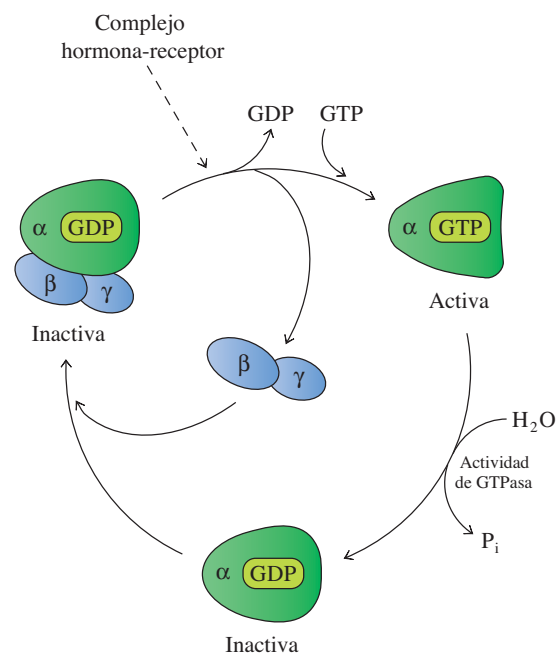
Muchos receptores de membrana interactúan con una familia de proteínas unidas a un nucleótido de guanina, llamadas **proteínas G**. Las proteínas G actúan como transductores, agentes que transmiten estímulos externos a enzimas efectoras. Las proteínas

Figura 9.38 ▶
Hidrólisis del 5′-trifosfato de guanosina (GTP) a 5′-difosfato de guanosina (GDP) y a fosfato (P_1).



G tienen actividad de GTPasa; esto es, catalizan lentamente la hidrólisis de 5′-trifosfato de guanosina (GTP, el análogo de guanina del ATP) para formar 5′-difosfato de guanosina (GDP) (figura 9.38). Cuando el GTP está unido a una proteína G está activo para transducción de señal, y cuando el GDP está unido a una proteína G está inactivo. La activación y desactivación cíclica de las proteínas G se ve en la figura 9.39. Las proteínas G

Figura 9.39 ▶
Ciclo de la proteína G. Las proteínas G se activan después de unirse a un complejo receptor-ligando, y se desactivan lentamente por su propia actividad de GTPasa. Tanto G_α–GTP/GDP como $G_{\beta\gamma}$ están unidas a la membrana.



que intervienen en señalización por receptores hormonales son proteínas periféricas de membrana que están en la superficie interna de la membrana plasmática. Cada proteína está formada por una subunidad α, una β y una γ. Las subunidades α y γ son proteínas de membrana ancladas a lípido; la subunidad α es una proteína anclada en acilo graso y la subunidad γ es una proteína anclada a prenilo. El complejo de $G_{\alpha\beta\gamma}$ y GDP es inactivo.

Cuando un complejo receptor de hormona se difunde lateralmente en la membrana, y se une a $G_{\alpha\beta\gamma}$, induce a que la proteína G cambie a una conformación activa. El GDP enlazado se intercambia rápidamente con GTP, y promueve la disociación de G_α-GTP a partir de $G_{\beta\gamma}$. Entonces, la G_α-GTP interactúa con la enzima efectora. La actividad de GTPasa de la proteína G funciona como reloj incorporado, ya que las proteínas G catalizan lentamente la hidrólisis de GTP a GDP. Cuando el GTP se hidroliza, el complejo G_α-GDP se reasocia a $G_{\beta\gamma}$ y se regenera el complejo $G_{\alpha\beta\gamma}$-GDP. Las proteínas G han evolucionado y son buenos interruptores, pero muy malos catalizadores; en el caso típico tienen una k_{cet} de sólo 3 min^{-1}.

Las proteínas G se encuentran en docenas de rutas de señalización, que incluyen a la adenilil ciclasa y las de inositol-fosfolípido que se describirán adelante. Una enzima efectora puede responder a proteínas G estimuladoras (G_s) o a proteínas G inhibidoras (G_i). Las subunidades α de distintas proteínas G son diferentes, y permiten tener especificidad variable, pero las unidades β y γ son parecidas y con frecuencia son intercambiables. Los humanos tienen dos docenas de proteínas α, cinco proteínas β y seis proteínas γ.

B. La ruta de señalización con adenilil ciclasa

Los nucleótidos cíclicos monofosfato de adenosina 3′-5′-cíclico (cAMP) y su análogo de guanina, el monofosfato de guanosina 3′,5′-cíclico (cGMP) son segundos mensajeros que ayudan a transmitir señales de fuentes externas hacia enzimas intracelulares. El cAMP se produce a partir de ATP por acción de adenilil ciclasa (figura 9.40), y el cGMP se forma a partir del GTP en una reacción similar.

Muchas hormonas que regulan el metabolismo intracelular ejercen sus efectos sobre células, activando la ruta de señalización de adenilil ciclasa. El enlazamiento de una hormona a un receptor estimulador hace que cambie la conformación del receptor y active la interacción entre el receptor y una proteína G estimuladora, G_s. El complejo receptor-ligando activa a G_s, que a su vez se une a la enzima efectora adenilil ciclasa, y la activa induciendo en forma alostérica un cambio conformacional en su sitio activo.

La adenilil ciclasa es una enzima integral de membrana, cuyo sitio activo ve hacia el citosol. Cataliza la formación de cAMP a partir de ATP. Entonces, el cAMP se difunde de la superficie de la membrana a través del citosol y activa una enzima llamada proteína cinasa A. Esta cinasa está formada por una subunidad reguladora dimérica y dos subunidades catalíticas, y es inactiva en su estado totalmente ensamblado. Cuando aumenta la concentración de cAMP en el citosol, como resultado de la transducción de señal por la adenilil ciclasa, cuatro moléculas de cAMP se unen a la subunidad reguladora de la cinasa, y liberan las dos subunidades catalíticas, que son enzimáticamente activas (figura 9.41). La proteína cinasa A, de serina-treonina, cataliza la fosforilación de los grupos hidroxilo de residuos específicos de serina y treonina en las enzimas. La fosforilación de las cadenas laterales de aminoácidos en las enzimas se invierte por acción de proteínas fosfatasas que catalizan la eliminación hidrolítica de los grupos fosforilo.

La capacidad de desactivar una ruta de transducción de señal es un elemento esencial en todos los procesos de señalización. Por ejemplo, la concentración de cAMP en el citosol sólo aumenta en forma transitoria. Una cAMP fosfodiesterasa cataliza la hidrólisis de cAMP a AMP (figura 9.40) y limita la duración del segundo mensajero. En altas concentraciones, las purinas metiladas cafeína y teofilina (figura 9.42), inhiben a la cAMP fosfodiesterasa y disminuyen así la velocidad de conversión de cAMP a AMP. Estos inhibidores prolongan e intensifican los efectos del cAMP y en consecuencia los efectos activadores de las hormonas estimuladoras.

Las hormonas que se unen a receptores estimuladores activan la adenilil ciclasa y elevan las concentraciones de cAMP intracelular. Las hormonas que se unen a receptores inhibidores inhiben la actividad de la adenilil ciclasa mediante interacción de receptor

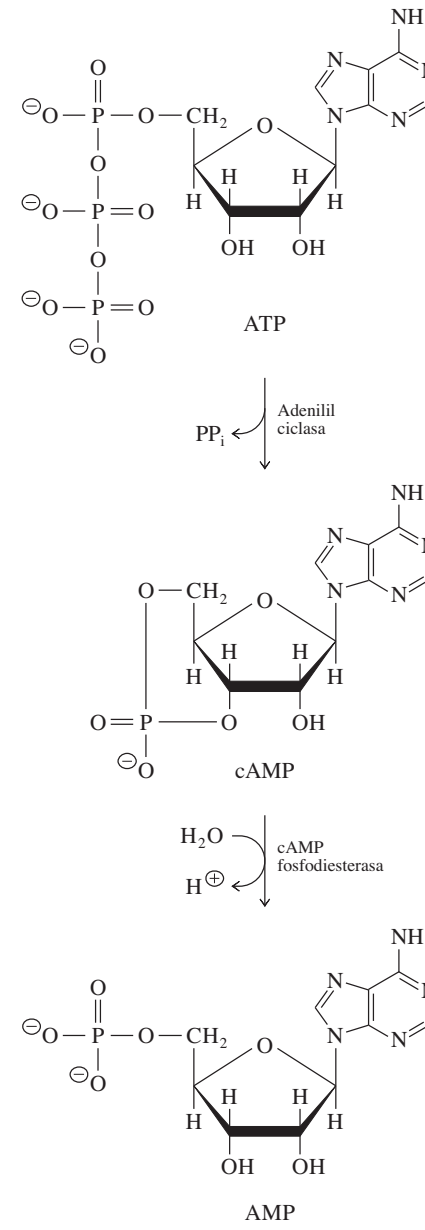


Figura 9.40 ▲
Producción e inactivación de cAMP. ATP se convierte a cAMP por la adenilil ciclasa, enzima transmembranal. A continuación el segundo mensajero se convierte en 5′-AMP por acción de una cAMP fosfodiesterasa citosólica.

La respuesta de *E. coli* a cambios de concentración de glucosa, modulados por cAMP, se describe en la sección 21.7B.

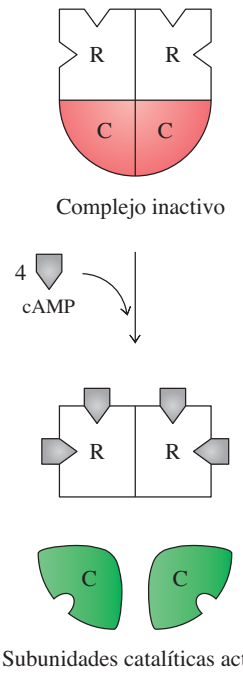


Figura 9.41 ▲
Activación de la proteína cinasa A. El complejo ensamblado es inactivo. Cuando se unen cuatro moléculas de cAMP al dímero de subunidad reguladora (R), se liberan las subunidades catalíticas (C).

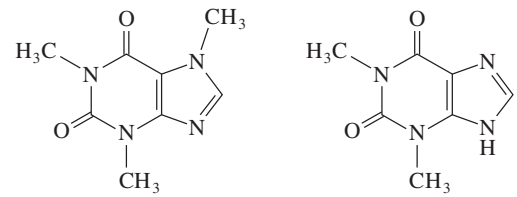


Figura 9.42 ▲
Cafeína y teofilina.

con el transductor G_i. La respuesta final de una célula a una hormona depende del tipo de receptores que tenga y del tipo de proteína G al que esté acoplada. Las propiedades principales de la ruta de señalización con adenilil ciclasa, incluyendo las proteínas G, se resumen en la figura 9.43.

C. La ruta de señalización inositol-fosfolípido

Otra de las transducciones principales produce dos segundos mensajeros diferentes, ambos derivados de un fosfolípido de membrana plasmática llamada fosfatidilinositol 4,5-*bi*fosfato (PIP_2) (figura 9.44). El PIP_2 es un componente menor de las membranas plasmáticas ubicado en la monocapa interna. Es sintetizado a partir de fosfatidilinositol por dos pasos sucesivos de fosforilación catalizados por cinasas dependientes de ATP.

Después de unirse un ligando a un receptor específico, la señal es trasducida a través de G_q, una proteína G. La forma activa de G_q, enlazada a GTP, activa a la enzima efectora fosfolipasa C, específica de fosfoinosítido, que está unida a la cara citoplásmica de la membrana plasmática. La fosfolipasa C cataliza la hidrólisis de PIP_2 a inositol 1,4,5-*tris*fosfato (IP_3) y diacilglicerol (figura 9.44). Tanto el IP_3 como el diacilglicerol son segundos mensajeros que transmiten la señal original al interior de la célula.

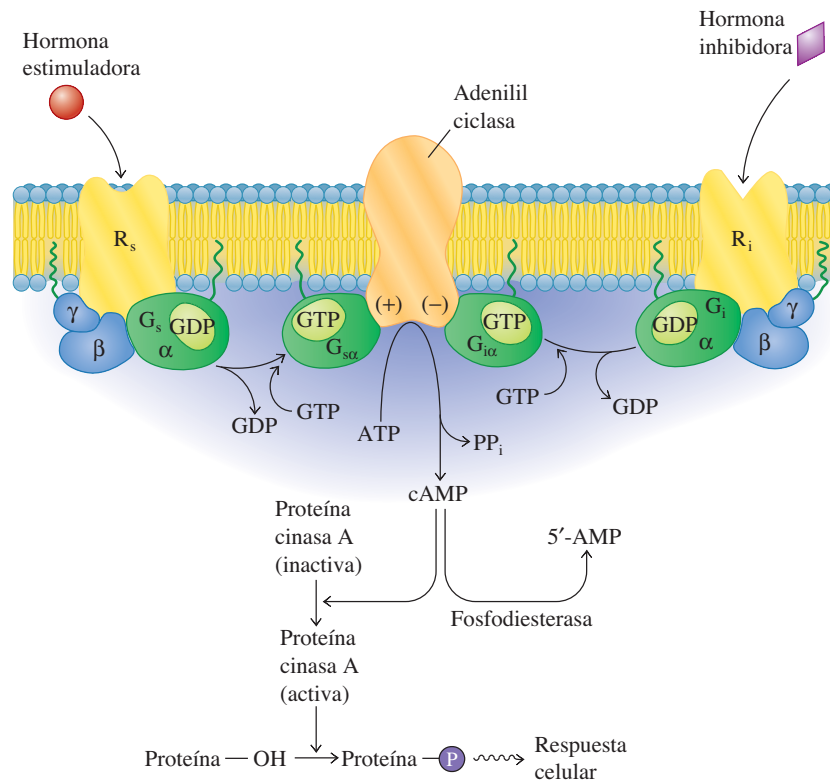
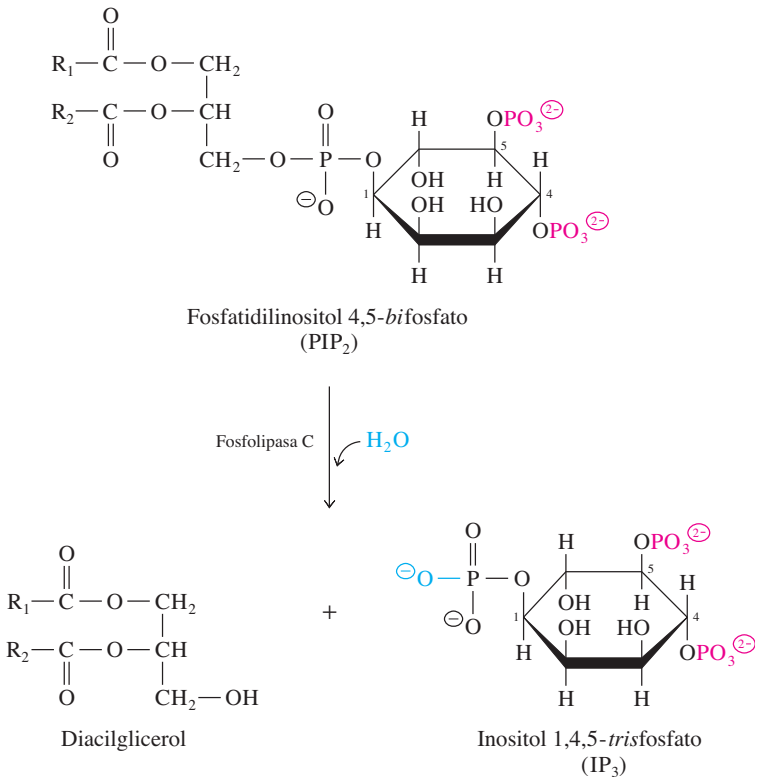


Figura 9.43 ▶
Resumen de la ruta de señalización de la adenilil ciclasa. El enlazamiento de una hormona con un receptor transmembranal simulador (R_s) lleva a la activación de la proteína G estimuladora (G_s) en el interior de la membrana. Otras hormonas se pueden enlazar a receptores inhibidores (R_i), que están acoplados a adenilil ciclasa por la proteína G inhibidora, G_i. G_s activa la enzima adenilil ciclasa, integral en la membrana, en tanto que G_i la inhibe. cAMP activa la proteína cinasa A, y el resultado es la fosforilación de las proteínas celulares.



◀ Figura 9.44
Fosfatidilinositol 4,5-*bi*fosfato (PLP_2); produce dos segundos mensajeros, inositol 1,4,5-*tris*-fosfato (IP_3) y diacilglicerol. El PLP_2 es sintetizado por la adición de dos grupos fosforilo (gris oscuro) al fosfatidilinositol, e hidrolizado a IP_3 y diacilglicerol por acción de la fosfolipasa C, específica de fosfoinosítido.

El IP_3 se difunde por el citosol y se une a un canal de calcio en la membrana del retículo endoplásmico. Eso hace que el canal de calcio se abra durante un tiempo corto y se libere Ca^{2+} de la luz del retículo endoplásmico al citosol. El calcio también es un mensajero intracelular, porque activa proteínas cinasas dependientes de calcio, que catalizan la fosforilación de diversas proteínas. La señal de calcio es de corta duración, porque el Ca^{2+} se bombea regresando a la luz del retículo endoplásmico cuando se cierra el canal.

El otro producto de la hidrólisis del PIP_3 es el diacilglicerol, que permanece en la membrana plasmática. La proteína cinasa C, que existe en equilibrio entre una forma soluble en citosol y una forma periférica unida a membrana, se mueve en la cara interna de la membrana plasmática, donde se une en forma transitoria y se activa por diacilglicerol y Ca^{2+}. La proteína cinasa C cataliza la fosforilación de muchas proteínas,

RECUADRO 9.6 Toxinas bacterianas y proteínas G

Las proteínas G son los sitios biológicos de las toxinas de cólera y de la tosferino, secretadas por las bacterias patógenas *Vibrio cholerae* y *Bordetella pertussis*, respectivamente. Ambas enfermedades implican sobreproducción de cAMP.

La toxina del cólera se une a la superficie de las células, y una subunidad de ella cruza la membrana plasmática y entra al citosol. Esta subunidad cataliza la modificación covalente de la subunidad α de la proteína G, G_s, e inactiva su actividad de GTPasa. La adenilil ciclasa de estas células permanece activada y las concentraciones de cAMP se mantienen altas. En personas infectadas con *V. cholerae*, el cAMP estimula ciertos transportadores en la membrana plasmática de las células intestinales y causa una secreción masiva de iones y agua hacia el intestino. La deshidratación que resulta por la diarrea puede ser fatal, a menos que se reabastezcan los fluidos.

La toxina de la tosferina cataliza la modificación covalente de G_1. En este caso, la proteína G modificada no puede sustituir GDP con GTP y en consecuencia no puede reducirse la actividad de adenilil ciclasa por receptores inhibidores. El aumento que resulta en las concentraciones de cAMP produce los síntomas de la tosferina.

alterando su actividad catalítica. Existen varias isoenzimas de la proteína cinasa C, cada una de ellas con distintas propiedades catalíticas y distribución tisular. Son miembros de la familia de la serina-treonina cinasa.

La señalización por la ruta inositol-fosfolípido se desactiva de varias maneras. La primera es cuando se hidroliza el GTP, G_q regresa a su forma inactiva y ya no estimula la fosfolipasa C. Las actividades de IP_3 y el diacilglicerol también son transitorias. El IP_3 se hidroliza rápidamente a otros fosfatos de inositol (que también pueden ser segundos mensajeros) e inositol. El diacilglicerol se convierte rápidamente en fosfatidato. Tanto el inositol como el fosfatidato se reciclan y regresan a fosfatidilinositol. Las propiedades principales de la ruta de señalización inositol-fosfolípido se resumen en la figura 9.45.

El fosfatidilinositol no es el único lípido de membrana que produce segundos mensajeros. Algunas señales extracelulares llevan a la activación de hidrolasas que catalizan la conversión de los esfingolípidos de membrana a esfingosina, esfingosina 1-fosfato o ceramida. La esfingosina inhibe a la proteína cinasa C, y la ceramida activa una proteína cinasa y una proteína fosfatasa. La esfingosina 1-fosfato puede activar la fosfolipasa D, que cataliza en forma específica la hidrólisis de la fosfatidil-colina. El fosfato y el diacilglicerol que se forman en esta hidrólisis parecen ser segundos mensajeros. El significado completo de la gran variedad de segundos mensajeros generados a partir de lípidos de membrana (cada uno con sus propios y específicos grupos acilo graso) todavía no se ha determinado.

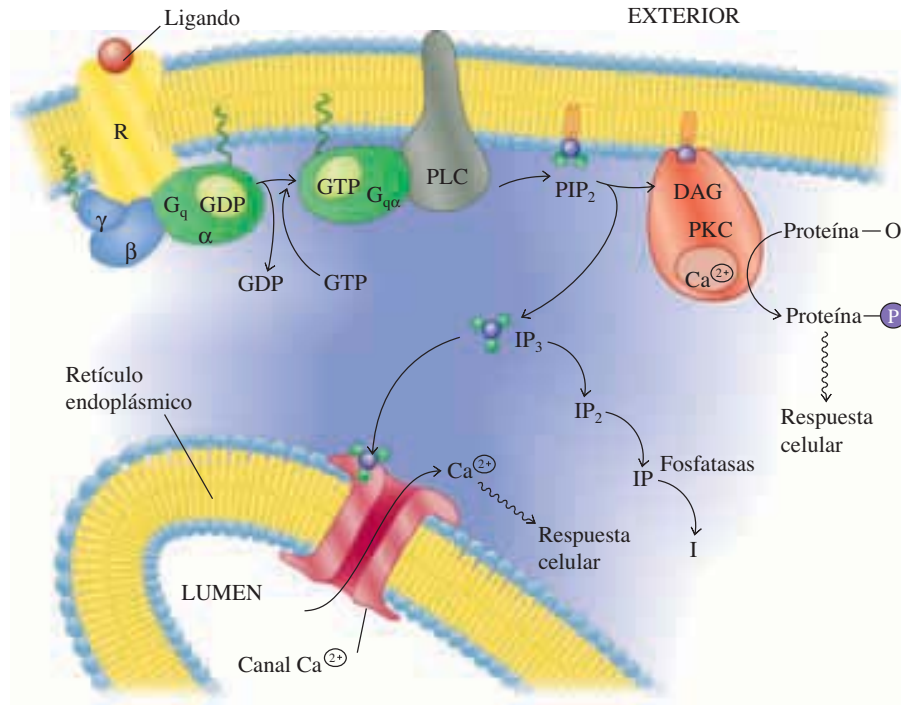


Figura 9.45 ▲
Ruta de señalización de inositol-fosfolípido. La unión de un ligando a su receptor de transmembrana (R) activa la proteína G (G_q). Esto, a su vez, estimula a una fosfolipasa C unida a la membrana específica (PLC) que cataliza la hidrólisis del fosfolípido PIP_2 en la hojilla interna de la membrana plasmática. Los segundos mensajeros que resultan, IP_3 y diacilglicerol (DAG), son responsables de llevar la señal al interior de la célula. El IP_3 se difunde hacia el retículo endoplásmico donde se une a un canal de Ca^{2+} en la membrana y lo abre, liberando el Ca^{2+} almacenado. El diacilglicerol permanece en la membrana plasmática, y junto con Ca^{2+} activa a la proteína enzima cinasa C (PKC).

D. Receptor de tirosina cinasas

Muchos factores de crecimiento funcionan mediante una ruta de señalización que comprende una proteína transmembranal multifuncional, llamada receptor de tirosina cinasa. Como se ve en la figura 9.46, las funciones del receptor, transductor y efector están en una sola proteína de membrana. Cuando un ligando se une al dominio extracelular del receptor, activa la actividad catalítica de la tirosina cinasa en el dominio intracelular, por dimerización del receptor. Cuando se asocian dos moléculas del receptor, cada dominio de tirosina-cinasa cataliza la fosforilación de residuos específicos de tirosina en su compañero, proceso llamado autofosforilación. La tirosina cinasa activada cataliza entonces la fosforilación de ciertas proteínas citosólicas, iniciando una cascada de eventos en la célula.

El receptor de insulina es un tetrámero $\alpha_2\beta_2$ (figura 9.47). Cuando la insulina se enlaza a las subunidades α, induce un cambio conformacional que une a los dominios de tirosina cinasa de las subunidades β. Cada dominio de tirosina cinasa en el tetrámero cataliza la fosforilación del otro dominio de cinasa. La tirosina cinasa activada cataliza también la fosforilación de residuos de tirosina en otras proteínas que ayudan a regular la utilización de nutrientes.

Muchas de las acciones de señalización de la insulina están mediadas a través del PIP_2 (sección 9.12C y figura 9.48, página siguiente). Más que causar la hidrólisis del PIP_2, la insulina (a través de proteínas llamadas sustratos de receptor de insulina, SRI), activa la fosfatidilinosítido 3-cinasa, enzima que cataliza la fosforilación de PIP_2 a fosfatidilinositol 3,4,5-*tris*fosfato (PIP_3). El PIP_3 es un segundo mensajero que activa en forma momentánea una serie de proteínas, incluyendo una proteína cinasa dependiente de fosfoinosítido. De esta manera, la fosfatidilinosítido 3-cinasa es el interruptor molecular que regula varias cascadas de proteína cinasa de serina-treonina.

Los grupos fosforilo son eliminados tanto de los receptores del factor de crecimiento como de las proteínas por la acción de proteínas tirosina fosfatasas. Aunque sólo se han estudiado pocas de esas enzimas, al parecer tienen un papel importante en la regulación de la ruta de señalización de tirosina-cinasa. Una forma de regulación parece ser el ensamblado y la separación localizados de los complejos de enzima.

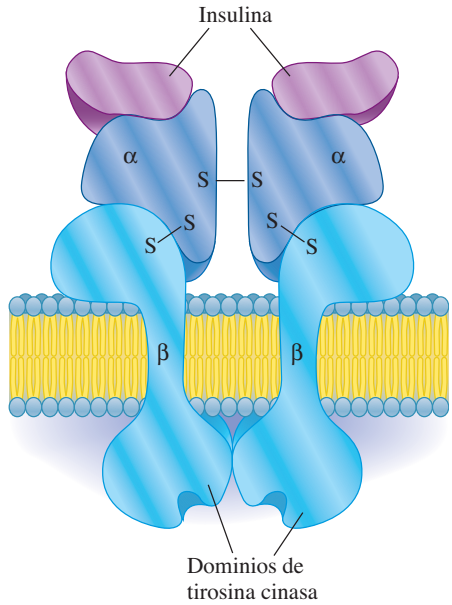


Figura 9.47▲
Receptor de insulina. Dos cadenas α, cada una con un sitio de enlazamiento de insulina, están unidas a dos cadenas β transmembranales , cada una con un dominio citosólico de tirosina cinasa. Después del enlazamiento de insulina a las cadenas α, el dominio de tirosina cinasa de cada cadena β cataliza la autofosforilación de residuos de tirosina en el dominio adyacente de cinasa. Los dominios de tirosina cinasa también catalizan la fosforilación de las proteínas llamadas sustratos receptores de insulina (SRI).

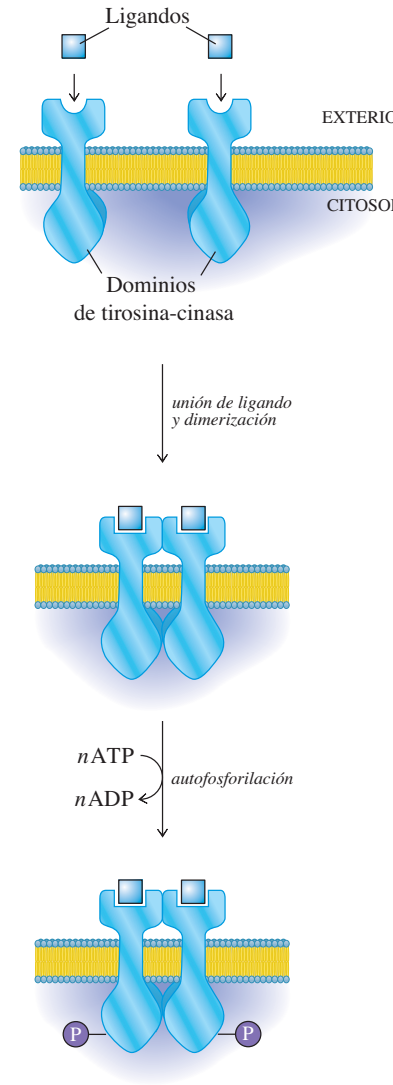


Figura 9.46 ▲
Activación de los receptores tirosina cinasas. La activación sucede como resultado de dimerización del receptor inducida por ligando. Cada dominio de cinasa cataliza la fosforilación de su compañero. El dímero fosforilado puede catalizar la fosforilación de diversas proteínas blanco.

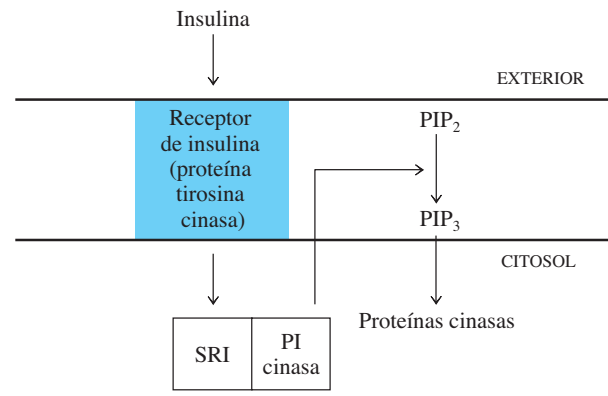


Figura 9.48 ▶
Formación de fosfatidilinositol 3,4,5-*tris*fosfato estimulado por insulina. La unión de la insulina con su receptor activa la actividad de la proteína tirosina cinasa del receptor, y lleva a la fosforilación de sustratos receptores de insulina (SRI). Los SRI fosforilados interactúan con fosfatidilinosítido 3-cinasa (PI cinasa) en la membrana plasmática, donde la enzima cataliza la fosforilación de PIP_2 a PIP_3. El PIP_3 actúa como segundo mensajero y lleva el mensaje de la insulina extracelular a ciertas proteínas cinasas intracelulares.

Resumen

1. Los lípidos son un grupo variado de compuestos orgánicos insolubles en agua.

2. Los ácidos grasos son ácidos monocarboxílicos, por lo regular con una cantidad par de átomos de carbono, que va de 12 a 20.

3. En general, los ácidos grasos se almacenan en forma de triacilgliceroles (grasas y aceites), que son neutros y no polares.

4. Los glicerofosfolípidos son anfipáticos y tienen un grupo cabeza polar y colas de acilo graso no polares, unidas a un respaldo de glicerina.

5. Los esfingolípidos, que hay en membranas de plantas y animales, contienen un respaldo de esfingosina. Las clases principales de esfingolípidos son esfingomielinas, cerebrósidos y gangliósidos.

6. Los esteroides son isoprenoides que contienen cuatro anillos fundidos.

7. Otros lípidos de importancia biológica son ceras, eicosanoides, vitaminas lipídicas y terpenos.

8. La base estructural de todas las membranas biológicas es la bicapa lipídica, que incluye lípidos anfipáticos como los glicerofosfolípidos, esfingolípidos y a veces colesterol. Los lípidos se pueden difundir rápidamente dentro de una hojilla de la bicapa.

9. Una membrana biológica contiene proteínas incrustadas en una bicapa lipídica o asociadas a ella. Las proteínas se pueden difundir lateralmente dentro de la membrana.

10. La mayor parte de las proteínas integrales de membrana abarcan el interior hidrofóbico de la bicapa, pero las proteínas periféricas de membrana están asociadas con menos firmeza a la superficie de la membrana. Las proteínas de membrana ancladas en lípidos están unidas en forma covalente a los lípidos de la bicapa.

11. Algunas moléculas pequeñas o hidrofóbicas se pueden difundir atravesando la bicapa. Los canales, poros y transportadores pasivos y activos median el movimiento de iones y moléculas polares a través de las membranas. El transporte activo requiere una fuente de energía. Las macromoléculas pueden moverse para entrar o salir de la célula mediante endocitosis y exocitosis, respectivamente.

12. Los estímulos químicos extracelulares transmiten sus señales al interior de la célula uniéndose a receptores. Un transductor pasa la señal a una enzima efectora que genera un segundo mensajero. Las rutas de transducción de señal incluyen con frecuencia a las proteínas G y a las proteínas cinasas. La ruta de señalización de adenilil ciclasa lleva a la activación de la proteína cinasa A, dependiente de cAMP. La ruta de señalización inositol-fosfolípido genera dos segundos mensajeros y conduce a la activación de la proteína cinasa C y a un aumento de la concentración de Ca^{2+} en el citosol. En los receptores de tirosina cinasas, la cinasa es parte de la proteína receptora.

Problemas

1. Escriba las fórmulas moleculares de los ácidos grasos siguientes: a) ácido nervónico (*cis*-Δ15-tetracosenoato, 24 carbonos); b) ácido vaccénico (*cis*-Δ11-octadecenoato) y c) EPA (todo *cis*-$\Delta^{5,8,11,14,17}$-icosapentaenoato).

2. Escriba las fórmulas moleculares de los siguientes ácidos grasos modificados:

a) 10-(Propoxi)decanoato, ácido graso sintético con actividad antiparasitaria, para el tratamiento de la enfermedad del sueño africana, causada por el protozoario *T. brucei* (el grupo propoxi es —O—$CH_2CH_2CH_3$).

b) Ácido fitánico (3,7,11,15-tetrametilhexadecanoato), que se encuentra en productos lácteos.

c) Ácido lactobacílico (11,12-metilenoctadecanoato), que se encuentra en diversos microorganismos.

3. El mayor consumo de ácidos grasos ω-3 poliinsaturados, relativamente abundantes en los aceites de pescado, puede ayudar a reducir el agregamiento de plaquetas y la trombosis (coagulación de la sangre). El mayor consumo de ácidos grasos ω-6, relativamente abundantes en aceites de maíz y de cártamo, suele reducir las concentraciones de colesterol en plasma. Clasifique los siguientes ácidos grasos, en ω-3, ω-6 o en ninguno de los dos: a) linolenato, b) linoleato, c) araquidonato, d) oleato, e) $\Delta^{8,11,14}$-eicosatrienoato.

4. El factor activador de plaquetas en mamíferos (PAF) es un mensajero en transducción de señal, y es un glicerofosfolípido con un enlace éter en el C-1. El PAF es un mediador potente de respuestas alérgicas, inflamación y el síndrome de choque tóxico. Dibuje la estructura del PAF (1-alquil-2-acetil-fosfatidilcolina), donde el grupo 1-alquilo es una cadena de C_{16}.

5. El ácido docosahexaenoico, 22:6 $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$ es el grupo acilo graso predominante en la posición C-2 del glicerol-3-fosfato de la fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina en muchas clases de pescado.
a) Dibuje la estructura del ácido docosahexaenoico (todos los dobles enlaces son *cis*).
b) Indique si el ácido docosahexaenoico es un ácido graso ω-3, ω-6 u ω-9.

6. Muchos venenos de víbora contienen fosfolipasa A_2, que cataliza la degradación de glicerofosfolípidos formando un ácido graso y una "lisolecitina". La naturaleza anfipática de las lisolecitinas les permite actuar como detergentes y romper la estructura de la membrana en los glóbulos rojos, haciéndolos estallar. Trace las estructuras de la fosfatidil serina (PS) y los productos (incluyendo una lisolecitina) que se formen en la reacción de PS con fosfolipasa A_2.

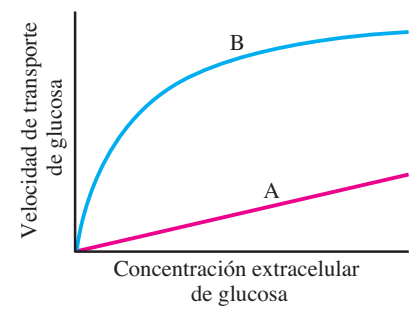
7. Dibuje las estructuras de los siguientes lípidos de membrana:
a) 1-estearoíl-2-oleoíl-3-fosfatidiletanolamina,
b) palmitoilesfingomielina y
c) miristoíl-β-D-glucocerebrósido.

8. a) El esteroide cortisol participa en el control del metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos. El cortisol se deriva del colesterol, y posee el mismo sistema de anillos de cuatro miembros, pero con: 1) un grupo ceto en el C-3; 2) doble enlace en los C-4-C-5 (en lugar de C-5-C-6 del colesterol; 3) un hidroxilo en el C-11, y 4) un grupo hidroxilo y un grupo —C(O)CH_2OH en el C-17. Dibuje la estructura del cortisol.
b) La ouabaína es un miembro de la familia de glicósidos cardiacos que se encuentra en plantas y animales. Este esteroide inhibe a la $Na^{\oplus}$–$K^{\oplus}$ ATPasa y el transporte de iones, y también puede intervenir en la hipertensión y alta presión sanguínea en los humanos. La ouabaína posee un sistema de cuatro anillos fundidos parecido al del colesterol, pero tiene las siguientes propiedades estructurales: 1) no tiene dobles enlaces en los anillos, 2) grupos hidroxi en el C-1, C-5, C-11 y C-14, 3) —CH2OH en el C-19, 4) anillo de lactona de cinco miembros no saturado en 2-3, en el C-17 (unido al C-3 del anillo de lactona) y 5) 6-desoximanosa unida a β1 del oxígeno del C-3. Dibuje la estructura de la ouabaína.

9. Una respuesta consistente en muchos organismos, frente al cambio de temperatura ambiental, es la reestructuración de las membranas celulares. En algunos peces, la fosfatidiletanolamina (PE) en la membrana lipídica microsómica del hígado contiene principalmente ácido docosahexaenoico, 22:6 $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$ en el C-2 del respaldo de glicerol-3-fosfato, y después un grupo acilo que puede ser saturado o monoinsaturado en el C-1. El porcentaje de la PE que contiene grupos acilo graso saturados o monoinsaturados se determinó en peces aclimatados a 10 °C o a 30 °C. A 10 °C, el 61% de las moléculas de PE contuvieron grupos acilo graso saturados en el C-1, y 39% de las moléculas de PE contenían grupos acilo graso monoinsaturados en el C-1. Cuando se aclimataron los peces a 30 °C,el 86% de los lípidos de PE contuvieron grupos acilo saturado en el C-1, en tanto que el 14% de las moléculas de PE tuvieron grupos acilo monoinsaturados en el C-1. [Brooks, S., Clark, G.T., Wright, S.M., Trueman, J.J., Postle, A.D., Cossins, A.R. y Maclean, N.M. (2002). Electrospray ionisation mass spectrometric analysis of lipid restructuring in the carp (*Ciprinus carpio L.*) during cold acclimatation. *J. Exp. Biol.* 205:3989-3997]. Explique el objeto de la reestructuración de la membrana que se observa en el cambio de temperatura ambiental.

10. Un gen mutante (*ras*) se encuentra hasta en una tercera parte de todos los cánceres humanos, incluyendo de pulmón, colon y páncreas, y puede ser responsable en parte del metabolismo alterado en las células tumorales. La proteína *ras* codificada por el gen *ras* interviene en las rutas de señalización que regulan el crecimiento y la división celular. Como la proteína *ras* debe convertirse en una proteína de membrana anclada en lípido para tener actividad señalizadora celular, se ha seleccionado a la enzima farnesil transferasa (FT) como objetivo quimioterapéutico potencial para la inhibición. Indique por qué la FT podría ser un objetivo razonable.

11. La glucosa entra a algunas células por difusión simple a través de canales o poros, pero entra a los glóbulos rojos por transporte pasivo. En la gráfica siguiente, indique cuál línea representa a la difusión por un canal o poro, y cuál representa al transporte pasivo. ¿Por qué difieren las velocidades de los dos procesos?

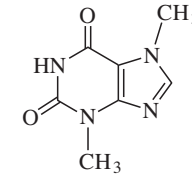


12. El gradiente de pH entre el estómago (pH 0.8-1.0) y las células de mucosa gástrica que recubren al estómago (pH 7.4) se mantiene mediante un sistema de transporte de $H^{\oplus}$–$K^{\oplus}$ ATPasa, parecido al sistema de transporte $Na^{\oplus}$–$K^{\oplus}$ATPasa impulsado por ATP (figura 9.35). El sistema de transporte $H^{\oplus}$–$K^{\oplus}$ ATPasa usa la energía del ATP para bombear $H^{\oplus}$ fuera de las células de la mucosa (mc) hacia el estómago (st) en un intercambio de iones $K^{\oplus}$. Los iones $K^{\oplus}$ que son transportados hacia las células de la mucosa se cotransportan después de regreso al estómago, junto con iones $Cl^{\ominus}$. El transporte neto es el movimiento de HCl hacia el estómago.

$$K^{\oplus}_{(mc)} + Cl^{\ominus}_{(mc)} + H^{\oplus}_{(mc)} + K^{\oplus}_{(st)} + ATP \rightleftharpoons$$
$$K^{\oplus}_{(st)} + Cl^{\ominus}_{(st)} + H^{\oplus}_{(st)} + K^{\oplus}_{(mc)} + ADP + P_i$$

Trace un diagrama para este sistema de $H^{\oplus}$–$K^{\oplus}$ ATPasa.

13. El chocolate contiene al compuesto teobromina, relacionado estructuralmente con la cafeína y la teofilina. Los productos de chocolate pueden ser tóxicos o letales para los perros, porque esos animales metabolizan la teobromina con más lentitud que los humanos. Se les afectan sus sistemas cardiaco, nervioso central y renal. Los primeros síntomas de envenenamiento con teobromina en los perros son náuseas y vómito, inquietud, diarrea, temblores musculares y orina o incontinencia incrementadas. Comente el mecanismo de la toxicidad de la teobromina en los perros.



Teobromina

14. En la ruta de señalización de inositol, tanto IP3 como diacilglicerol (DAG) son segundos mensajeros hormonales. Si ciertas proteínas cinasas en las células se activan uniéndose a Ca^{2+} ¿cómo actúan el IP3 y el DAG en forma complementaria para excitar las respuestas celulares en el interior de las células?

15. En algunas formas de diabetes, una mutación en la subunidad β del receptor de insulina elimina la actividad enzimática de la subunidad. ¿Cómo afecta la mutación a la respuesta celular a la insulina? Si hay más insulina (por ejemplo, inyectada) ¿puede contrarrestar este defecto?

16. La proteína ras (se describió en el problema 10) es una proteína G mutada que carece de actividad de GTPasa. ¿Cómo afecta la ausencia de esta actividad a la ruta de señalización de adenilil ciclasa?

Lecturas seleccionadas

Generalidades

Gurr, M. I. y Harwood, J. L. (1991). *Lipid Biochemistry: An introduction*, 4th ed. (London: Chapman and Hall). Referencia general de estructura y metabolismo de lípidos.

Vance, D. E. y Vance, J. E., eds. (1991). *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (New York: Elsevier). Contiene muchas crónicas.

Membranas

Dowhan, W. (1997). Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annu. Rev. Biochem*. 66:199-232. Explica cómo la manipulación de fosfolípidos en bacterias indica sus funciones biológicas.

Jacobson, K., Sheets, E. D. y Simson, R. (1995). Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science* 268:1441-1442. Describe la difusión lateral de las proteínas de membrana.

Lau, E. C. (2003). Lipid rafts make for slippery platforms. *J. Cell Biol.* 162:365-370.

Simnos, K. e Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572.

Singer, S. J. (1992). The structure and function of membranes: a personal memoir. *J. Membr. Biol.* 129:3-12. Destaca el modelo de mosaico fluido y describe la relación de propiedades recién descubiertas con el modelo.

Proteínas de membrana

Casey, P. J. y Seabra, M. C. (1996). Protein prenyltransferases. *J. Biol. Chem.* 271:5289-5292. Describe las enzimas responsables de la prenilación de las proteínas de membrana.

Bijlmakers, M-J. y Marsh, M. (2003). The on-off story of protein palmitoylation. *Trends Cell Biol.* 13:32-42.

Transporte en membrana

Borst, P. y Elferink, R. O. (2002). Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu. Rev. Biochem.* 71:537-592.

Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D. y Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816-824.

Clapham, D. (1997). Some like it hot: spicing up ion channels. *Nature* 389:783-784. Describe los chiles y el receptor de capsaicina.

Doyle, D. A., Cabral, J. M., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T. y McKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of $K^{\oplus}$ conduction and selectivity. *Science* 280:69-75.

Jahn, R. y Südhof, T. C. (1999). Membrane fusion and exocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68:863-911.

Kaplan, J. H. (2002). Biochemistry of Na,K-TPase. *Annu. Rev. Biochem*. 71:511-535.

Loo, T. W. y Clarke, D. M. (1999). Molecular dissection of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Biochem. Cell Biol.* 77:11-23. Repaso de la estructura y las funciones de esta proteína.

Transducción de señal

Fantl, W. J., Johnson, D. E. y Williams, L. T. (1993). Signaling by receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 62:453-481. Repaso de los mecanismos biológicos de señalización a través

de receptores de factor de crecimiento de tirosina cinasa.

Hamm, H. E. (1998). The many faces of G protein signaling. *J. Biol. Chem*. 273:669-672. Resumen de estudios recientes de proteínas G, estructurales y mecanicistas.

Hodgkin, M. N., Pettitt, T. R., Martin, A., Michell, R. H., Pemperton, A. J. y Wakelam, M. J. O. (1998). Diacylglycerols and phosphatidates: which molecular species are intracellular messengers? *Trends Biochem. Sci.* 23:200-205. Evaluación de los papeles de segundo mensajero de los lípidos generados por fosfolipasas.

Hurley, J. H. (1999). Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenilyl cyclase. *J. Biol. Chem*. 274:7599:7602.

Luberto, C. y Hannun, Y. A. (1999). Sphingolipid metabolism in the regulation of bioactive molecules. *Lipids* 34 (Supl.):S5-S11. Describe los papeles de segundo mensajero de la esfingosina, esfingosina 1-fosfato y ceramida.

Prescott, S. M. (1999). A thematic series on kinases and phosphatases that regulate lipid signaling. *J. Biol. Chem.* 274:8345-8346.

Shepherd, P. R., Withers, D. J. y Siddle, K. (1998). Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem. J.* 333:471-490.

10

capítulo diez

Introducción al metabolismo

En los capítulos anteriores se hizo una descripción de las estructuras y funciones de los componentes principales de las células vivas, desde pequeñas moléculas hasta los agregados más grandes, como las membranas, pasando por los polímeros. Los próximos nueve capítulos se enfocan en las actividades bioquímicas que asimilan, transforman, sintetizan y degradan muchos de los nutrientes y componentes celulares ya descritos. La biosíntesis de proteínas y de ácidos nucleicos, que representa una proporción apreciable de todas las células, se describirá en los capítulos 20 a 22.

Ahora se irá de la estructura molecular a la dinámica de las funciones celulares. A pesar del marcado desplazamiento de la descripción, se verá que las transformaciones enzimáticas de las biomoléculas, así como las moléculas mismas, son gobernadas por leyes químicas y físicas básicas. Al acercarse paso a paso, a partir de los fundamentos establecidos en las dos primeras partes de este libro, se podrá describir cómo funcionan las células. En este capítulo se expondrán algunos temas generales de metabolismo y los principios termodinámicos que forman la base de las actividades celulares.

10.1 El metabolismo es la suma de las reacciones celulares

El metabolismo es toda la red de reacciones químicas efectuadas por las células vivas. Los **metabolitos** son las pequeñas moléculas que son el producto intermedio en la degradación o biosíntesis de los biopolímeros. El término *metabolismo intermediario* se aplica a las reacciones donde intervienen esas moléculas de bajo peso molecular. Conviene examinar por separado las reacciones que sintetizan moléculas (reacciones anabólicas) y reacciones que degradan moléculas (reacciones catabólicas).

Las **reacciones anabólicas** son responsables de la síntesis de todos los compuestos necesarios para la conservación, crecimiento y reproducción celular. Estas reacciones de biosíntesis forman metabolitos simples, como aminoácidos, carbohidratos, coenzimas,

Arriba: Colibrí. No obstante su gran rapidez de metabolismo, sus reacciones metabólicas básicas son iguales a las de organismos tan distintos como mohos, babosas, arces y ballenas.

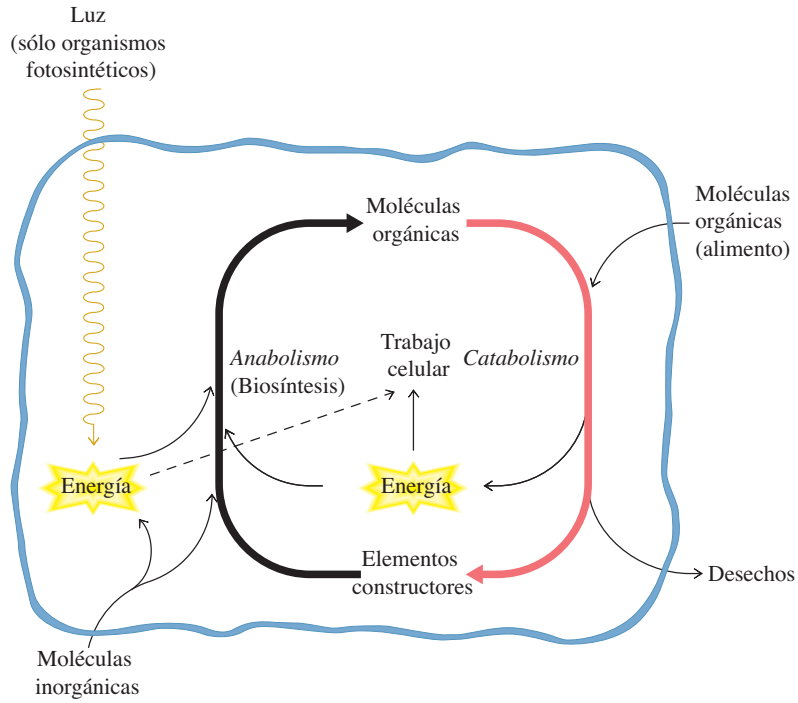
nucleótidos y ácidos grasos. También producen moléculas mayores, como proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos complejos (figura 10.1).

En algunas especies, todas las moléculas complejas que forman una célula se sintetizan a partir de precursores inorgánicos (dióxido de carbono, amoniaco, fosfatos inorgánicos, etc.). Algunas especies obtienen energía de esas moléculas inorgánicas o en la creación del potencial de membrana (sección 9.11). Los organismos fotosintéticos usan la energía luminosa para impulsar reacciones de biosíntesis.

Las **reacciones catabólicas** degradan grandes moléculas para liberar moléculas más pequeñas y energía. Esas reacciones también degradan moléculas pequeñas para formar productos inorgánicos. Todas las células efectúan reacciones de degradación como parte de su metabolismo celular normal, pero algunas especies se basan en ellas como su única fuente de energía. Por ejemplo, los animales requieren moléculas orgánicas como alimento. La fuente última de estas moléculas orgánicas es una ruta biosintética en otra especie. Considérese que todas las reacciones catabólicas implican la ruptura de compuestos que fueron sintetizados por una célula viva: sea la misma célula, una célula distinta en el mismo individuo, o una célula en un organismo diferente. Además de la energía necesaria en la biosíntesis, los organismos necesitan energía para efectuar otras clases de actividad celular, como transporte y movimiento.

Al observar bacterias o grandes organismos multicelulares se encontrará una inquietante variedad de adaptaciones biológicas. Quizá en la Tierra vivan más de 10 millones de especies, y varios cientos de millones de especies habrán llegado y se habrán ido en el curso de la evolución. Los organismos multicelulares tienen una notable especialización de tipos de células o tejidos. A pesar de esta extraordinaria diversidad, la bioquímica de las células vivas se parece en forma sorprendente no sólo en la composición química y la estructura de los componentes celulares, sino también en las rutas metabólicas mediante las cuales se modifican los compuestos.

En los últimos años se han determinado las secuencias completas de los genomas de varias especies. Por primera vez se empieza a tener una imagen completa de todas las redes metabólicas de esas especies, con base en las secuencias de los genes que codifican las enzimas metabólicas. *Escherichia coli* tiene unos 900 genes que codifican enzimas que se usan en el metabolismo intermedio, y consta de unas 130 rutas diferentes. Estos genes forman 21% de los que hay en el genoma. Otras especies de bacterias tienen una cantidad parecida de enzimas, que efectúan las reacciones metabólicas bási-



◀ Figura 10.1
Anabolismo y catabolismo. En las reacciones anabólicas se usan moléculas pequeñas y energía química para sintetizar moléculas orgánicas, y también en la ejecución de trabajo celular. La energía solar es fuente importante de energía metabólica en las bacterias fotosintéticas y en las plantas. Algunas moléculas, incluyendo las que se obtienen del alimento, se catabolizan y liberan energía, así como bloques constructivos monoméricos, o productos de desecho. En las figuras restantes de este capítulo, las flechas gris claro representan rutas de biosíntesis, y las flechas gris oscuro corresponden a rutas de catabolismo.

cas; pero algunas especies contienen rutas adicionales. Por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis*, bacteria que causa la tuberculosis, tiene unas 250 enzimas que intervienen en el metabolismo de ácidos grasos, cinco veces las que tiene *E. coli*. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un miembro unicelular del reino de los hongos. Su genoma contiene 5 900 genes codificadores de proteína. De ellos, 1 200 (20%) codifican las enzimas que intervienen en el metabolismo intermedio y de energía. El nematodo *Caenorhabditis elegans* es un animal multicelular pequeño con muchas de las mismas células y tejidos especializados que tienen animales más grandes. Su genoma codifica 19 100 proteínas, de las que se cree que 5 300 (28%) se requieren en diversas rutas de metabolismo intermedio. En la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, alrededor de 2 400 (17%) de sus 14 100 genes pueden estar implicados en las rutas metabólicas intermedias y en la bioenergía. No se conoce la cantidad exacta de genes necesarios para el metabolismo básico en los humanos, pero es probable que se requieran unos 5 000 genes. (El genoma humano tiene cerca de 30 000 genes).

En general, los organismos muestran los mismos temas comunes:

1. Los organismos o las células mantienen concentraciones internas específicas de iones inorgánicos, de metabolitos y de enzimas. Las membranas celulares son la barrera física que aparta del ambiente a los componentes celulares.
2. Los organismos extraen energía de fuentes externas para impulsar reacciones que consumen energía. Los organismos fotosintéticos obtienen energía de la conversión de energía solar en energía química. Otros organismos obtienen energía de la ingestión y catabolismo de compuestos que producen energía.
3. Las rutas metabólicas en cada organismo están especificadas por los genes que contiene su genoma.
4. Los organismos y las células interactúan con su ambiente. Las actividades de las células deben acoplarse a la disponibilidad de energía. Cuando es abundante el suministro de energía del ambiente, los organismos crecen y se reproducen. Cuando es limitado el suministro de energía del ambiente, las demandas de energía se pueden satisfacer, en forma temporal, usando almacenamientos internos, o desacelerando la velocidad metabólica, como en la hibernación, esporulación o formación de semillas. Si la escasez se prolonga, los organismos mueren.
5. Las células de los organismos no son conjuntos estáticos de moléculas, aun cuando las concentraciones de la mayor parte de las moléculas casi son constantes. Muchos componentes celulares se sintetizan y degradan en forma continua; esto es, tienen recambio. Las concentraciones de otros compuestos cambian como respuesta a modificaciones de condiciones externas o internas.

En la sección de este libro acerca del metabolismo se describen las reacciones metabólicas que operan en la mayor parte de las especies. Por ejemplo, las enzimas de la glicólisis (la degradación de la glucosa) y la gluconeogénesis (biosíntesis de la glucosa) están presentes en casi todas las especies. Aunque muchas células poseen el mismo conjunto de reacciones metabólicas centrales, la diferenciación de célula y organismo es posible por reacciones enzimáticas adicionales, específicas del tejido o de la especie.

10.2 Rutas metabólicas

En su mayoría, las reacciones metabólicas están catalizadas por enzimas, por lo que una descripción completa del metabolismo no sólo abarca las reacciones, los productos intermedios y los productos finales de las reacciones celulares, sino también las características de las enzimas relevantes. La mayor parte de las células pueden efectuar cientos o miles de reacciones. Esta complejidad puede manejarse si se subdivide en forma sistemática el metabolismo en segmentos o ramas. Se empezará describiendo por separado el metabolismo de los cuatro grupos principales de biomoléculas:

carbohidratos, lípidos, aminoácidos y nucleótidos. Dentro de cada una de las cuatro áreas del metabolismo se reconocerán distintas secuencias de reacciones metabólicas, llamadas rutas.

A. Las rutas son secuencias de reacciones

Una **ruta** es el equivalente biológico de un esquema de síntesis en química orgánica. Una ruta metabólica es una serie de reacciones en las que el producto de una reacción es el sustrato de la reacción siguiente. Algunas rutas metabólicas pueden estar formadas por sólo dos pasos, en tanto que otras podrán tener una longitud de una docena de pasos.

No es fácil definir los límites de una ruta metabólica. En el laboratorio, una síntesis química tiene un sustrato inicial obvio, y un producto final obvio; pero las rutas celulares están interconectadas en formas que dificultan definir un inicio y un fin. Por ejemplo, en el catabolismo de la glucosa (capítulo 11), ¿dónde comienza y dónde termina la glicólisis? ¿Comienza con polisacáridos (como glucógeno y almidón), glucosa extracelular o glucosa intracelular? ¿Termina la ruta en piruvato, lactato o etanol? Se pueden asignar puntos inicial y final en forma algo arbitraria, con frecuencia siguiendo la tradición, o para facilitar el estudio. Las reacciones y las rutas se pueden vincular y formar rutas metabólicas extensas.

Las rutas metabólicas individuales pueden asumir formas diferentes. Una ruta metabólica lineal, como la biosíntesis de la serina, es una serie de reacciones independientes, catalizadas por enzimas, donde el producto de una reacción es el sustrato de la siguiente reacción en la ruta (figura 10.2a). La mayor parte de las rutas que se encuentran son rutas lineales. Una ruta metabólica cíclica, como el ciclo del ácido cítrico, también es una secuencia de pasos catalizados por enzimas, pero la secuencia forma un ciclo cerrado, por lo que se regeneran los compuestos intermedios en cada vuelta del ciclo (figura 10.2b). Sólo hay pocos ejemplos de rutas metabólicas cíclicas. En una ruta metabólica espiral, como la biosíntesis de ácidos grasos (sección 16.6), el mismo conjunto de enzimas se usa en forma repetitiva para alargar o acortar determinada molécula (figura 10.2c). Todas las reacciones de polimerización se pueden unir y formar una ruta espiral.

Cada tipo de ruta puede tener puntos de ramificación, donde entran o salen metabolitos. En la mayor parte de los casos no se destaca la naturaleza ramificada de las rutas. Para describir las bases del metabolismo se enfoca en las rutas principales, y después en los metabolitos más importantes. También se enfoca en las rutas que se suelen encontrar en todas las especies. Éstas son las rutas bioquímicas fundamentales.

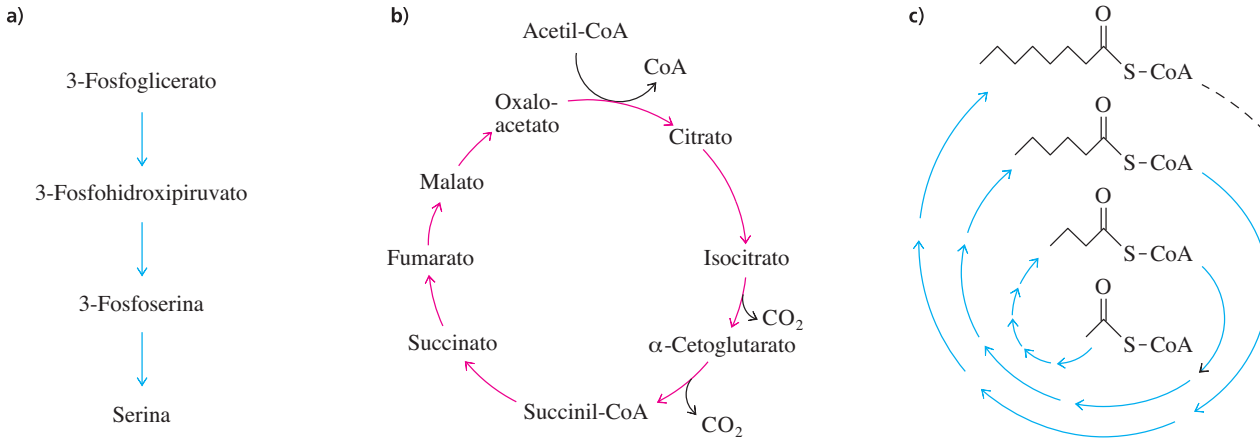


Figura 10.2 ▲
Formas de las rutas metabólicas. **a)** La biosíntesis de la serina es un ejemplo de una ruta metabólica lineal. El producto de cada paso es el sustrato para el siguiente paso. **b)** La secuencia de reacciones en una ruta cíclica forma un ciclo cerrado. En el ciclo del ácido cítrico, un grupo acetilo es metabolizado mediante reacciones que regeneran los intermedios en el ciclo. **c)** En la biosíntesis de ácidos grasos, que es una ruta espiral, el mismo conjunto de enzimas cataliza un alargamiento progresivo de la cadena de acilo.

B. El metabolismo se efectúa en pasos discretos

Los ambientes intracelulares son relativamente estables. Las reacciones en las células se efectúan a temperaturas y presiones moderadas, a concentraciones bastante bajas de reactivos y a pH casi neutro. Esas condiciones requieren numerosos catalizadores enzimáticos eficientes. Pero ¿por qué hay tantas reacciones distintas que se efectúan en las células vivas? En principio, debería ser posible hacer la degradación y la síntesis de moléculas orgánicas complejas con mucho menos reacciones.

Una razón de las rutas en muchos pasos es la poca especificidad de reacción de las enzimas. Cada sitio activo sólo cataliza un paso en una ruta. La síntesis, o la degradación, de una molécula sigue entonces una ruta metabólica definida por la disponibilidad de enzimas adecuadas. Como regla general, una sola reacción catalizada por enzima sólo puede romper o formar unos pocos enlaces covalentes de una sola vez. Con frecuencia, la reacción implica la transferencia de un solo grupo químico.

Otra razón de los muchos pasos en las rutas metabólicas es controlar el consumo y la producción de energía. El flujo de energía es mediado por donadores y aceptores de energía que transportan cuantos discretos de energía. Como se verá, la energía transferida en una sola reacción casi nunca es mayor de 60 kJ mol^{-1}. Las rutas para la biosíntesis de moléculas requieren transferencia de energía en varios puntos. Cada reacción que consume energía corresponde a un solo paso en la secuencia de reacciones. La síntesis de glucosa a partir de dióxido de carbono y agua necesita un consumo de ~2 800 kJ mol^{-1} de energía. Termodinámicamente no es posible sintetizar la glucosa en un solo paso (figura 10.3). De igual modo, gran parte de la energía liberada durante un proceso catabólico (como la oxidación de glucosa a dióxido de carbono y agua, que libera ~2 800 kJ mol^{-1}) se transfiere a aceptores individuales paso por paso, y no se libera en una gran e ineficiente explosión. La eficiencia de la transferencia de energía en cada paso nunca es 100%, pero se conserva un porcentaje considerable de energía

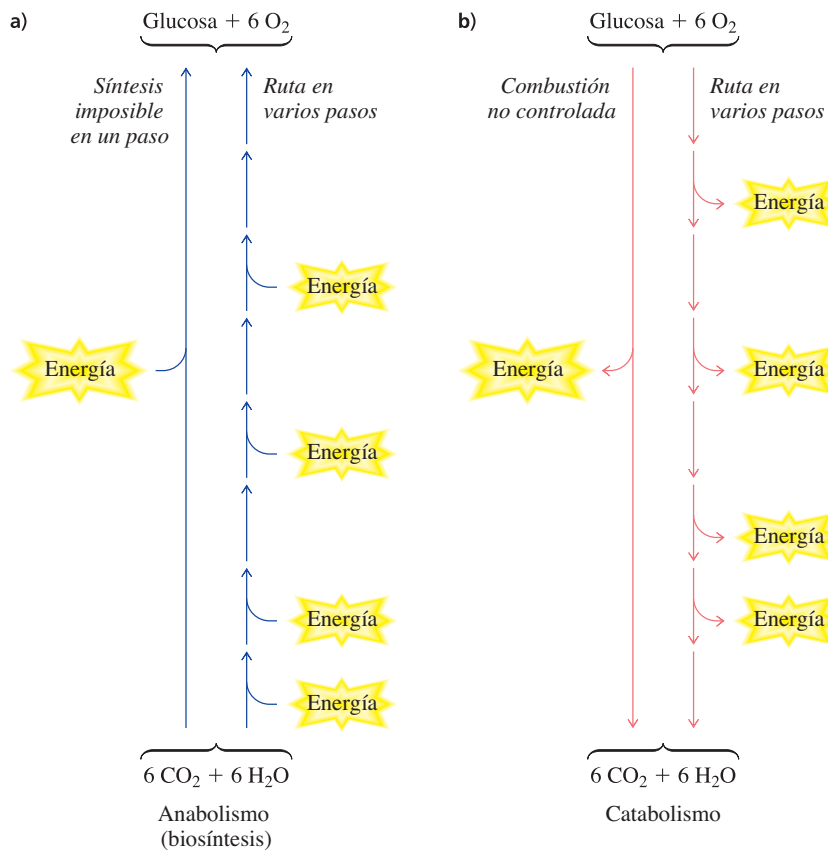


Figura 10.3 ▶
Comparación de rutas de uno y de varios pasos. **a)** La síntesis de la glucosa no puede hacerse en un solo paso. La biosíntesis en varios pasos se acopla con el consumo de pequeños cuantos de energía, procedentes del ATP y de NADH. **b)** La combustión no controlada de glucosa genera una gran cantidad de energía de una sola vez. Una ruta en varios pasos, catalizada por enzima, libera la misma cantidad de energía, pero conserva gran parte de ella en una forma manejable.

en forma manejable. Los portadores de energía que aceptan y donan energía, como los nucleótidos de adenosina (ATP) y las nicotinamida coenzimas (NADH) se encuentran en todas las formas de vida.

C. Las rutas metabólicas están reguladas

El metabolismo no es aleatorio, sino que está muy controlado. Los organismos reaccionan a cambios de condiciones del ambiente, como la disponibilidad de energía o de nutrientes. Los organismos también responden a interacciones genéticamente programadas. Por ejemplo, durante la embriogénesis o reproducción, el metabolismo de las células individuales puede cambiar en forma radical.

Las respuestas de los organismos a las condiciones cambiantes van desde la sintonización fina hasta la reorganización espectacular de los procesos metabólicos que gobiernan la síntesis o la degradación de biomoléculas y la generación o el consumo de energía. Los procesos de control pueden afectar muchas rutas, o bien sólo unas pocas, y el tiempo de respuesta puede variar desde menos de un segundo hasta horas, o más. Las respuestas biológicas más rápidas se efectúan en milisegundos, e incluyen cambios en el paso de pequeños iones (por ejemplo, $Na^{\oplus}$, $K^{\oplus}$ y Ca^{2+}) a través de las membranas celulares. La transmisión de impulsos nerviosos y la contracción muscular dependen de movimientos de iones. Las respuestas más rápidas también son las de menor duración; las respuestas más lentas suelen durar más.

La mayor parte de las rutas suceden en una sola dirección, bajo condiciones fisiológicas. Cuando un metabolito entra a una ruta, cada paso de la ruta sucede en secuencia, sin retroceder y malgastar materiales celulares o energía. Las biomoléculas suelen sintetizarse y degradarse en rutas distintas, aunque algunos pasos pueden ser comunes a las rutas anabólicas y catabólicas. En determinado momento o lugar dentro de la célula, estos conjuntos comunes de reacciones suelen estar regulados para que sólo se efectúen en una dirección.

El flujo de metabolitos por una ruta se llama **flujo**. Considérese una ruta lineal sencilla, que comienza con el sustrato A y termina con el producto P.

$$A \xrightarrow{E_1} B \xrightarrow{E_2} C \xrightarrow{E_3} D \xrightarrow{E_4} E \xrightarrow{E_5} P \qquad \textbf{(10.1)}$$

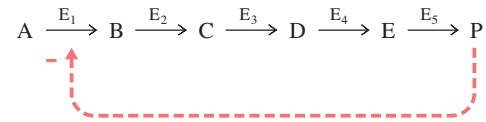
Si la concentración de A es lo suficientemente alta, ocurrirá la primera reacción y se formará el compuesto intermedio B. A medida que se acumule B, comenzará a servir como sustrato en la segunda reacción y se formará C. Por último se formará el producto final P. El flujo de material por la ruta continuará mientras haya un abastecimiento continuo del sustrato inicial (A) *y también* si es retirado el producto final (P). Bajo estas condiciones, el flujo por la ruta sucede a una velocidad relativamente constante que depende de las propiedades de las enzimas E_1, E_2, E_3, E_4 y E_5. Las concentraciones de B, C, D y E no cambian mucho. Esto se parece a la condición de estado estable encontrada en la sección 5.3A.

El estado estable es como una cubeta con una fuga por un pequeño agujero en el fondo. Si entra agua a la cubeta con una rapidez exactamente igual a la rapidez con que sale por el agujero, el nivel del agua en la cubeta permanece constante al paso del tiempo, aun cuando el agua misma esté fluyendo. En una ruta metabólica formada por varias reacciones, todos los productos intermedios están en un estado estable. El reactivo inicial en la ruta se renueva continuamente, y el producto final se elimina de manera constante. Las concentraciones de productos intermedios permanecen invariables, aun cuando haya flujo.

El flujo por una ruta disminuirá si la concentración del sustrato inicial baja de cierto valor umbral. También disminuirá si la concentración del producto final sube. Estos son cambios que afectan a todas las rutas. Sin embargo, además de estos efectos normales de concentración, hay controles reguladores especiales que afectan la actividad de enzimas determinadas en la ruta. Es tentador imaginar que la regulación de una ruta se hace por manipulación eficiente de una sola reacción enzimática, que limita la velocidad, la cual a veces se parece a la parte angosta de un reloj de arena. Sin embargo, en

muchos casos eso sería simplificar demasiado. El flujo por la mayor parte de las rutas depende de controles en diversos pasos. Esos pasos, en general, son reacciones unidireccionales que hay en las rutas. En una reacción unidireccional (llamada también "irreversible"), las concentraciones de sustratos y productos en estado estable están muy alejadas de las concentraciones de equilibrio, por lo que la reacción tiende a ir sólo en una dirección. Una enzima reguladora aporta un grado especial de control sobre el flujo general de la ruta en la que participa. Como los intermedios o los cosustratos de diversas fuentes pueden entrar o salir de una ruta, la existencia de varios puntos de control es normal; es rara una ruta lineal y aislada.

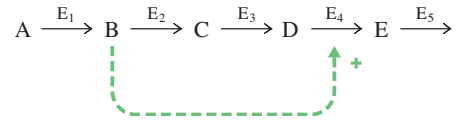
Hay dos pautas comunes de control metabólico: inhibición por retroalimentación y activación por corrección anticipada. La **inhibición por retroalimentación** es cuando un producto (por lo general el producto final) de una ruta controla la velocidad de su propia síntesis, por inhibición de alguno de los primeros pasos, y en general el primer paso (la primera reacción, exclusiva de la ruta).



(10.2)

La ventaja de esta pauta de control en una ruta de biosíntesis es obvia. Cuando se dispone de una cantidad suficiente de producto (P), se inhibe el flujo por la ruta. Se restaura el flujo sólo cuando P se agota. La ruta se inhibe en uno de sus primeros pasos; de otro modo, los intermedios metabólicos se acumularían en forma innecesaria.

La **activación por corrección anticipada** se efectúa cuando un metabolito producido en uno de los primeros pasos de una ruta activa a una enzima que cataliza una reacción más adelante en la ruta.



(10.3)

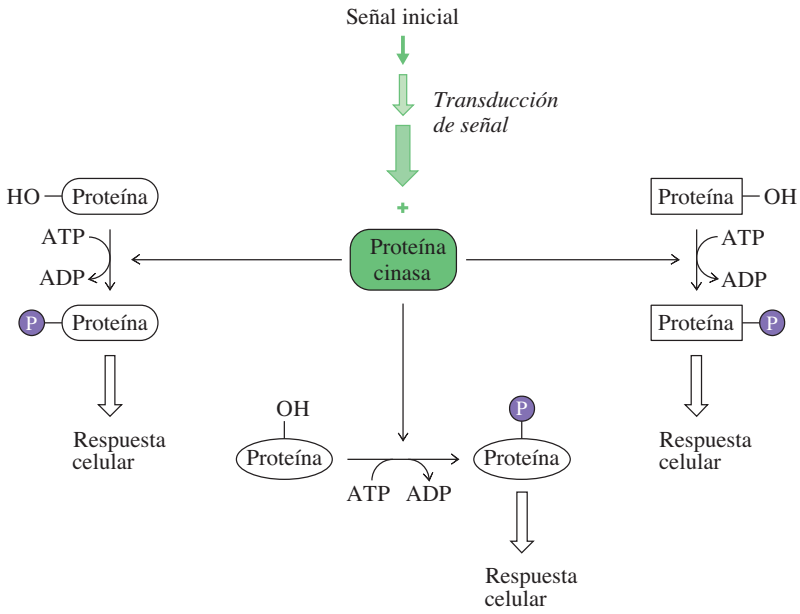
En este ejemplo, la actividad de la enzima E_1 (que convierte A a B) se coordina con la actividad de la enzima E_4 (que convierte D a E). Un aumento del metabolito B aumenta el flujo a través de la ruta.

En la sección 5.10 se describe la modulación de enzimas reguladoras individuales. Los activadores e inhibidores alostéricos, que suelen ser metabolitos, pueden alterar rápidamente la actividad de muchas de esas enzimas, induciendo cambios de conformación que afectan la actividad catalítica. En los próximos capítulos se verán muchos ejemplos de modulación alostérica. La modulación alostérica de enzimas reguladoras es rápida, pero no tanto en las células como lo puede ser con enzimas aisladas.

La actividad de las enzimas interconvertibles también se puede alterar en forma rápida y reversible mediante modificación covalente, normalmente por adición y eliminación de grupos fosforilo. La fosforilación, catalizada por **proteína cinasas** a expensas del ATP, se invierte por la acción de **proteína fosfatasas**, que catalizan la eliminación hidrolítica de grupos fosforilo. Las enzimas individuales difieren si su respuesta a la fosforilación es de activación o de desactivación. Las enzimas interconvertibles en rutas catabólicas en general se activan por fosforilación y se desactivan por desfosforilación; la mayor parte de las enzimas interconvertibles en las rutas anabólicas se desactivan por fosforilación y se vuelven a activar por desfosforilación. La actividad de cinasas con varias especificidades permite una regulación coordinada de más de una ruta metabólica mediante una señal. La naturaleza de cascada de las rutas de señalización intracelular, descrita en la sección 9.12, también quiere decir que se amplifica la señal inicial (figura 10.4).

En la parte 4 de este libro se examinan con más detalle la regulación de la expresión génica y la síntesis de proteínas.

Las cantidades de enzimas específicas se pueden alterar aumentando las velocidades de síntesis o de degradación. Eso suele ser un proceso lento, comparado con la activación e inhibición alostérica o covalente. Sin embargo, la renovación de ciertas



◀ Figura 10.4
Papel regulador de una proteína cinasa. El efecto de la señal inicial es amplificado por la cascada de señalización. La fosforilación de distintas proteínas celulares por la cinasa activada da como resultado una regulación coordinada de distintas rutas metabólicas. Algunas rutas pueden activarse, en tanto que otras se inhiben. (P) representa un grupo fosfato unido a una proteína.

enzimas puede ser rápida. Téngase en mente que varios modos de regulación pueden actuar en forma simultánea dentro de una ruta metabólica.

D. Evolución de las rutas metabólicas

La evolución de las rutas metabólicas es un campo activo de investigación bioquímica. Estos estudios se han facilitado mucho por la publicación de docenas de secuencias completas de genoma, en especial de genomas procariotas. Hoy se pueden comparar enzimas de ruta en numerosas bacterias que muestran una variedad diversa de rutas. Muchas de esas rutas dan claves de la organización y estructura de las rutas primitivas que había en las primeras células.

Hay muchas rutas posibles para la formación de una ruta metabólica nueva. El caso más simple es la adición de un nuevo paso terminal a una ruta preexistente. Imagínese la ruta hipotética de la ecuación 10.1. La ruta original podría haber terminado con la producción del metabolito E después de una transformación de cuatro pasos, a partir del sustrato A. La disponibilidad de cantidades apreciables de E podría favorecer la evolución de una nueva enzima (en este caso E_5) que podría usar E como sustrato para fabricar P. Las rutas que llevan a la síntesis de asparagina y glutamina con las rutas de aspartato y de glutamato son ejemplos de este tipo de evolución de ruta.

En otros casos puede formarse una nueva ruta al evolucionar una rama de una ruta preexistente. Por ejemplo, imagínese la conversión de C a D en la ruta de la ecuación 10.1. Esta reacción es catalizada por la enzima E_3. La enzima E_3 primitiva podría no ser tan específica como la enzima moderna. Además de obtener el producto D, podría haber sintetizado una cantidad menor de X, otro metabolito. La disponibilidad del producto X podría haber conferido alguna ventaja selectiva a la célula, lo que favorece la duplicación del gen E_3. La divergencia posterior de las dos copias del gen dio lugar a dos enzimas relacionadas, que catalizaron en forma específica las reacciones $C \rightarrow D$ y $C \rightarrow X$. Hay muchos ejemplos de evolución por duplicación y divergencia de gen (por ejemplo, la lactato deshidrogenasa y la malato deshidrogenasa, sección 4.7). (Se hace énfasis principalmente en la especificidad extremada de las reacciones enzimáticas, pero de hecho muchas enzimas pueden catalizar varias reacciones diferentes usando sustratos y productos de estructura parecida).

Algunas rutas podrían haber evolucionado "en reversa." Una ruta primitiva podría haber utilizado un suministro abundante del metabolito E en el ambiente, para fabricar

el producto P. Cuando se agotó la disponibilidad de E, al paso del tiempo, hubo presión selectiva para evolucionar hacia una enzima nueva (E_4) que pudiera usar el metabolito D para renovar el metabolito E. Cuando D fue el limitador de velocidad, las células pudieron ganar una ventaja selectiva utilizando C para hacer más metabolito D. De esta forma, la ruta moderna completa evolucionó por retroevolución, agregando en forma sucesiva precursores más simples y alargando la ruta.

A veces, toda la ruta puede duplicarse y la evolución adaptativa que sigue lleva a dos rutas independientes, con enzimas homólogas que catalizan las reacciones afines. Hay buenas pruebas de que las rutas que llevan a la biosíntesis de triptófano e histidina evolucionaron de esta manera. También se pueden obtener enzimas de una ruta para usarlas en otra, sin duplicar necesariamente una ruta completa. Se verán varios ejemplos de enzimas homólogas que se usan en rutas diferentes.

Por último, una ruta puede evolucionar "invirtiendo" una ruta existente. En la mayor parte de los casos hay un paso en una ruta que en esencia es irreversible. Supóngase que el tercer paso de una ruta hipotética (C → D) es irreversible y no puede catalizar la conversión de D a C, porque la reacción normal está muy lejos del equilibrio. La evolución de una nueva enzima que pueda catalizar D → C podría permitir que toda esta ruta invirtiera su dirección y que convirtiera P en A. Es la forma en que evolucionó la ruta de la glucosa, a partir de la ruta de biosíntesis de glucosa.

Todas estas posibilidades tienen su papel en la evolución de nuevas rutas. A veces, una nueva ruta evoluciona por una combinación de diferentes mecanismos de evolución adaptativa. La evolución de la ruta del ciclo del ácido cítrico es un ejemplo (sección 12.9).

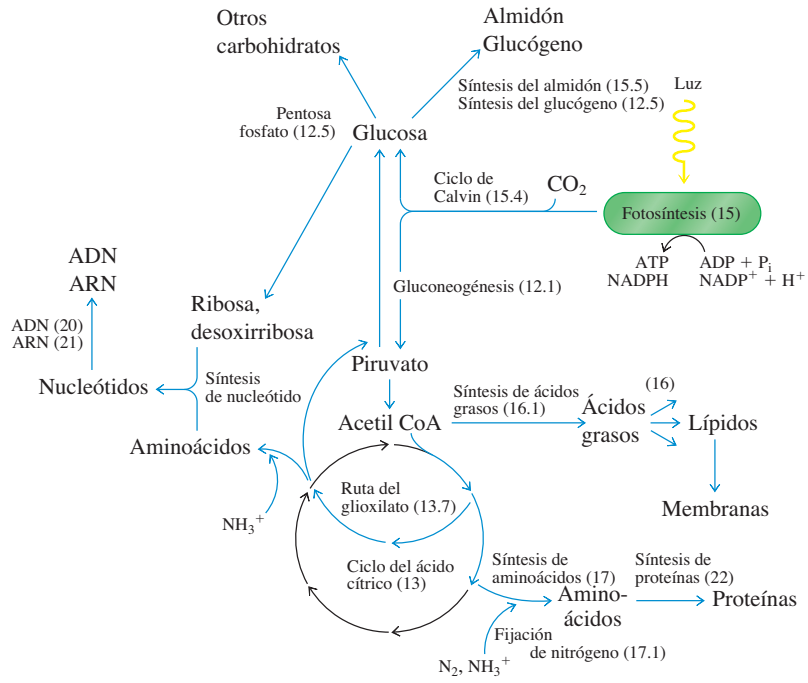
10.3 Principales rutas en las células

En esta sección se presenta una perspectiva de la organización y funciones de algunas rutas metabólicas principales, que se describirán en los capítulos siguientes. Se empieza con las rutas anabólicas, o de biosíntesis, porque son las más importantes para el crecimiento y la reproducción. Todas las especies deben poder sintetizar la mayor parte de sus sustancias clave, en especial macromoléculas como ADN, ARN y proteínas. Una descripción general de las rutas de biosíntesis se ve en la figura 10.5. Todas las células requieren una fuente externa de carbono, hidrógeno, oxígeno, fósforo y azufre, más otros iones inorgánicos (sección 1.2). Algunas especies, en particular las bacterias y las plantas, pueden crecer y reproducirse usando fuentes inorgánicas de esos elementos esenciales. A esas especies se les llama **autótrofas**. En contraste, las **heterótrofas** necesitan moléculas orgánicas, como la glucosa. Los animales son heterótrofos.

En las rutas de biosíntesis se requiere energía. Los organismos más complejos (¡desde un punto de vista bioquímico!) son los autótrofos, porque pueden generar energía metabólica útil a partir de la luz solar, u oxidando moléculas inorgánicas, como $NH_4^{\oplus}$, H_2 o H_2S. La energía obtenida en estas reacciones se usa para sintetizar el ATP, compuesto rico en energía, y el poder reductor de NADH. Estos cofactores transfieren su energía a reacciones de biosíntesis.

Hay dos tipos de especies autótrofas. Los **fotoautótrofos** obtienen la mayor parte de su energía en la fotosíntesis, y su fuente principal de carbono es el CO_2. Esta categoría incluye las bacterias fotosintéticas, las algas y las plantas. Los **quimioautótrofos** obtienen su energía oxidando moléculas inorgánicas y usando CO_2 como fuente de carbono. Algunas especies bacterianas son quimioautótrofas, pero no hay ejemplos en los eucariotas.

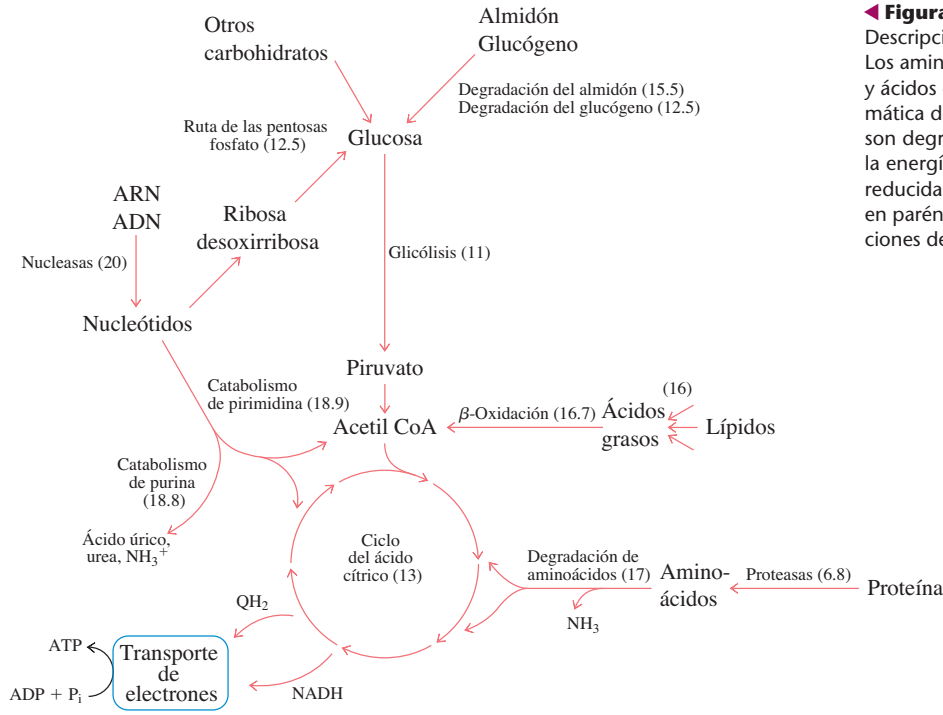
Los heterótrofos también se pueden subdividir en dos categorías. Los **fotoheterótrofos** son organismos fotosintéticos que requieren un compuesto orgánico como fuente de carbono. Hay varios grupos de bacterias que son capaces de capturar energía luminosa, pero deben basarse en algunas moléculas orgánicas como fuente de carbono. Los **quimioheterótrofos** son organismos no fotosintéticos que requieren moléculas orgánicas como fuente de carbono. En general, su energía metabólica se obtiene de la



◀ Figura 10.5
Descripción general de las rutas anabólicas. Las moléculas grandes se sintetizan a partir de otras más pequeñas añadiendo carbonos (en general, derivados del CO_2) y nitrógeno (por lo general como $NH_3^{\oplus}$). Entre las rutas principales están el ciclo del ácido cítrico, que suministra los compuestos intermedios en la biosíntesis de aminoácidos, y la gluconeogénesis, que resulta en la producción de glucosa. La energía para las rutas biosintéticas es suministrada por la luz en organismos fotosintéticos, o por la descomposición de moléculas inorgánicas en los autótrofos. (Los números entre paréntesis indican los capítulos y las secciones en este libro).

descomposición de las moléculas orgánicas importadas. Nosotros somos quimioheterótrofos, como todos los animales, la mayoría de los protistas, todos los hongos y muchas bacterias.

En la figura 10.6 se ven las principales rutas catabólicas. Como regla general, estas rutas de degradación no son simplemente la inversa de las rutas de biosíntesis, aunque pueden compartir algunos de los pasos. Por ejemplo, la gluconeogénesis y la glicólisis



◀ Figura 10.6
Descripción general de las rutas catabólicas. Los aminoácidos, nucleótidos, monosacáridos y ácidos grasos se forman por hidrólisis enzimática de sus polímeros respectivos. Luego son degradados en reacciones oxidativas, y la energía se conserva en ATP y coenzimas reducidas (sobre todo NADH). (Los números en paréntesis se refieren a los capítulos y secciones de este libro).

no son idénticas, pero muchas de las reacciones individuales se efectúan por igual en ambas direcciones. Nótese que el ciclo del ácido cítrico es una ruta principal, tanto en el metabolismo anabólico como en el catabólico. En el modo de catabolismo, es la principal fuente de energía que impulsa la síntesis de ATP. Las rutas principales de catabolismo son para eliminar las moléculas indeseables y para generar energía que se pueda usar en otros procesos.

En los próximos capítulos se examinará con detalle el metabolismo. La descripción de las rutas metabólicas comienza en el capítulo 11, con la glicólisis, una ruta ubicua para catabolismo de glucosa. Hay una larga tradición en bioquímica para introducir a los alumnos en la glicólisis antes que a otras rutas. Esto se debe a que se conoce mucho sobre las reacciones en esta ruta, e ilustrarán muchos de los principios fundamentales del metabolismo que se encontrarán en otras rutas. En la glicólisis, la hexosa se fragmenta en dos metabolitos de tres carbonos. Esta ruta puede generar ATP en un proceso llamado fosforilación a nivel sustrato. Con frecuencia, el producto de la glicólisis es piruvato, que se puede convertir en acetil-CoA para su oxidación ulterior.

En el capítulo 12 se describe la síntesis de la glucosa, o gluconeogénesis. También en este capítulo se cubre el metabolismo del almidón y del glucógeno, y se describe la ruta con la que se oxida la glucosa para producir NADPH para las rutas de biosíntesis, y ribosa para la síntesis de nucleótidos. El ciclo del ácido cítrico (capítulo 13) facilita la oxidación completa de los carbonos del acetato en la acetil-CoA hasta dióxido de carbono, y la energía liberada se conserva en la formación de NADH y ATP u otro nucleósido trifosfato. Según se indicó antes, el ciclo del ácido cítrico es una parte esencial tanto del metabolismo anabólico como del catabólico.

La producción de ATP es una de las reacciones más importantes del metabolismo. La síntesis de casi todo el ATP se acopla al transporte de electrones asociado a la membrana (capítulo 14). En el transporte de electrones, la energía de las coenzimas reducidas, como la NADH, se usa para generar un gradiente electroquímico de protones a través de una membrana celular. La energía potencial de este gradiente se controla para impulsar la fosforilación de ADP a ATP.

$$ADP + P_i \longrightarrow ATP + H_2O \qquad \textbf{(10.4)}$$

Se verá que las reacciones del transporte de electrones asociado a la membrana, y de la síntesis de ATP acoplada, se parecen en muchos aspectos a las reacciones que captan energía luminosa durante la fotosíntesis (capítulo 15).

En otros tres capítulos más se examinará el anabolismo y el catabolismo de los lípidos, aminoácidos y nucleótidos. En el capítulo 16 se describe el almacenamiento de nutrientes, como triacilgliceroles, y la oxidación posterior de los ácidos grasos. Este capítulo describe también la síntesis de los fosfolípidos y de compuestos isoprenoides. El metabolismo de aminoácidos se describe en el capítulo 17. Aunque los aminoácidos se presentaron como los elementos constructivos de las proteínas, hay algunos que también tienen participación importante como combustibles metabólicos y precursores de biosíntesis. La biosíntesis y degradación de nucleótidos se consideran en el capítulo 18. A diferencia de las otras tres clases de biomoléculas, los nucleótidos se catabolizan principalmente para su excreción, y no para producir energía. La incorporación de nucleótidos a los ácidos grasos y de los aminoácidos a las proteínas son rutas anabólicas de gran importancia. En los capítulos 20 a 22 se describen estas reacciones de biosíntesis.

10.4 Compartimentación y metabolismo entre órganos

Algunas rutas metabólicas se localizan en regiones determinadas dentro de una célula. Por ejemplo, la ruta de transporte de electrones asociada a la membrana, acoplada a la síntesis de ATP, tiene lugar dentro de la membrana. En las bacterias, esta ruta está en

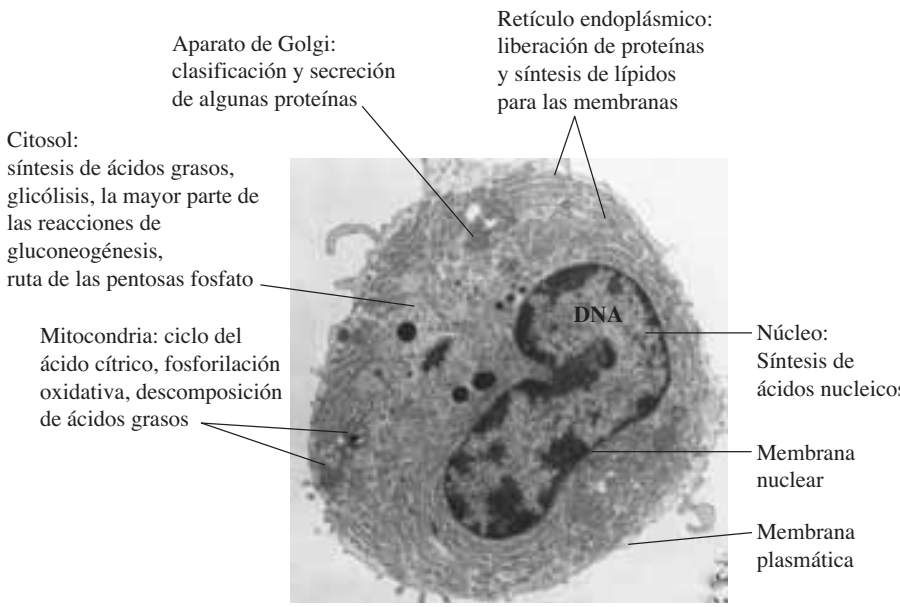


Figura 10.7 ▲
Compartimentación de procesos metabólicos dentro de una célula eucariota. (No se indican todas las rutas y organelos).

la membrana plasmática, y en los eucariotas está en la membrana mitocondrial. La fotosíntesis es otro ejemplo de una ruta asociada a membrana en bacterias y eucariotas.

En los eucariotas, las rutas metabólicas se localizan en varios compartimientos delimitados por membrana (figura 10.7). Por ejemplo, las enzimas que catalizan la síntesis de ácidos grasos están en el citosol, en tanto que las que catalizan la descomposición de los ácidos grasos están dentro de las mitocondrias. Una consecuencia de la compartimentación es que se pueden encontrar conjuntos separados de metabolitos dentro de una célula. Esta disposición permite el funcionamiento simultáneo de rutas metabólicas opuestas. La compartimentación también puede ofrecer la ventaja de altas concentraciones locales de metabolitos, y la regulación coordinada de enzimas. Algunas de las enzimas que catalizan reacciones en las mitocondrias (que han evolucionado desde un procariota simbionte) están codificadas por genes mitocondriales; este origen explica su compartimentación.

También hay compartimentación a nivel molecular. Las enzimas que catalizan algunas rutas están organizadas físicamente en complejos multienzimáticos (sección 5.11). Con esos complejos, la canalización de metabolitos evita su dilución por difusión. Algunas enzimas que catalizan reacciones adyacentes en las rutas están unidas a membranas, y se pueden difundir rápidamente en la membrana para poder interactuar.

Las células individuales de organismos multicelulares mantienen concentraciones diferentes de metabolitos, dependiendo en parte de la presencia de transportadores específicos que faciliten la entrada y salida de metabolitos. Además, dependiendo de los receptores en la superficie de la célula y de los mecanismos de transducción de señal que haya, las células individuales responden en formas diferentes a las señales externas.

En los organismos multicelulares, la compartimentación también puede tener la forma de especialización de los tejidos. La división del trabajo entre los tejidos permite que haya regulación de los procesos metabólicos específicos de sitios. Las células de distintos tejidos se distinguen por su complemento de enzimas. Ya se está familiarizado con las funciones especializadas del tejido muscular, los glóbulos rojos y las células cerebrales, pero la compartimentación celular es una propiedad común, incluso en las especies simples. Por ejemplo, en las cianobacterias, la ruta para fijación de nitrógeno está secuestrada en células especiales llamadas heterocistos (figura 10.8). Esta separación es necesaria porque la nitrogenasa es desactivada por el oxígeno, y las células que hacen la fotosíntesis requieren un suministro abundante de oxígeno.

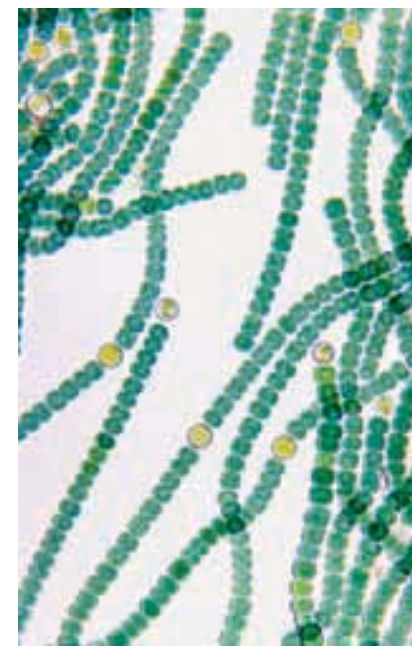


Figura 10.8 ▲
Anabaena spherica. Muchas especies de cianobacterias forman largos filamentos multicelulares. Algunas células especializadas se han adaptado para efectuar fijación de nitrógeno. Esos heterocistos se han redondeado, y están rodeados por una pared celular engrosada. Los heterocistos se unen a las células adyacentes mediante poros internos. La formación de heterocistos es un ejemplo de la compartimentación de rutas metabólicas.

10.5 Determinación de la espontaneidad de las reacciones metabólicas por el cambio de energía libre real (no estándar) de energía libre de Gibbs

El cambio de energía libre de Gibbs es una medida de la energía disponible en una reacción (sección 1.4B). La energía libre de Gibbs *estándar* para cualquier reacción ($\Delta G^{\circ\prime}_{\text{reacción}}$) es el cambio bajo condiciones estándar de presión (1 atm), de temperatura (25 °C = 298 K) y de concentración de ion hidrógeno (pH = 7.0). La concentración de cada reactivo y producto es 1 M bajo condiciones estándar. Para las reacciones bioquímicas, se supone que la concentración de agua es 55 M.

El cambio de energía libre de Gibbs estándar en una reacción se puede calcular mediante tablas, donde aparecen las energías libres de Gibbs de formación ($\Delta_f G^{\circ\prime}$) de moléculas de gran importancia bioquímica.

$$\Delta G^{\circ\prime}_{\text{reacción}} = \Delta_f G^{\circ\prime}_{\text{productos}} - \Delta_f G^{\circ\prime}_{\text{reactivos}} \qquad \textbf{(10.5)}$$

Sin embargo, se debe tener en mente que la ecuación 10.5 sólo se aplica al cambio de energía libre bajo condiciones estándar, donde las concentraciones de productos y reactivos son 1 M. El cambio real de energía libre de Gibbs (ΔG) para una reacción depende de las concentraciones reales de los reactivos y los productos, según se describió en la sección 1.4B. La relación entre cambio de energía libre estándar y cambio de energía libre real es

$$\Delta G_{\text{reacción}} = \Delta G^{\circ\prime}_{\text{reacción}} + RT \ln \frac{[\text{productos}]}{[\text{reactivos}]} \qquad \textbf{(10.6)}$$

Para un proceso químico o físico, el cambio de energía libre se expresa en función de los cambios de entalpía (contenido de calor) y entropía (aleatoriedad) cuando los reactivos se convierten en productos a presión y volumen constante.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \qquad \textbf{(10.7)}$$

ΔH es el cambio de entalpía, ΔS es el cambio de entropía y T es la temperatura, en kelvins.

Cuando ΔG de una reacción es negativo, la reacción es espontánea; esto es, puede efectuarse sin suministro externo de energía. Cuando ΔG es positivo, la reacción no es espontánea. Para que se efectúe esa reacción debe suministrarse la energía suficiente, desde el exterior del sistema, para que el cambio de energía libre sea negativo. Una reacción con cambio positivo de energía libre se efectúa en forma espontánea en la dirección inversa. Cuando ΔG es cero, la reacción está en equilibrio, y no hay una síntesis neta del producto.

Como los cambios tanto en entalpía como en entropía son parte de ΔG, la suma de esas aportaciones a determinada temperatura (como se indica en la ecuación 10.7) debe ser negativa para que la reacción sea espontánea. Así, aun cuando ΔS para determinado proceso sea negativa (es decir, los productos son más ordenados que los reactivos), una ΔH suficientemente negativa puede superar la disminución de entropía y hacer que una ΔG sea menor que cero. De igual modo, aun cuando ΔH sea positiva (es decir, que los productos tengan un contenido calorífico mayor que los reactivos), una ΔS suficientemente positiva puede compensar el aumento de entalpía y hacer que ΔG sea negativa. Los procesos espontáneos que se efectúan por una ΔS positiva grande son impulsados por entropía. Como ejemplos de procesos impulsados por entropía están el plegamiento de proteínas (sección 4.10) y la formación de bicapas lípidas (sección 9.8A), y ambos dependen del efecto hidrofóbico (sección 2.5D). Los procesos de plegamiento de proteína y de formación de bicapa lípida dan como resultado estados de menor entropía para la molécula de proteína y los componentes de la bicapa, respectivamente. Sin embargo, la disminución de entropía se compensa con un gran aumento de entropía de las moléculas de agua, que antes estaban enlazadas.

Para cualquier reacción enzimática dentro de un organismo vivo, el cambio de energía libre real (el cambio de energía libre bajo las condiciones celulares) debe ser

menor que cero para que la reacción ocurra en la dirección en que esté escrita. Muchas reacciones metabólicas tienen cambios de energía libre de Gibbs *estándar* ($\Delta G^{\circ\prime}_{\text{reacción}}$) que son positivos. La diferencia entre ΔG y $\Delta G^{\circ\prime}$ depende de las condiciones celulares. La condición más importante que afecta al cambio de energía libre en las células es la concentración de los sustratos y los productos de una reacción. Considérese la reacción

$$\text{A} + \text{B} \rightleftharpoons \text{C} + \text{D} \qquad \textbf{(10.8)}$$

En el equilibrio, la relación de productos entre sustratos es, por definición, la constante de equilibrio (K_{eq}), y el cambio de energía libre de Gibbs bajo esas condiciones es cero.

$$(\text{en el equilibrio}) \qquad K_{\text{eq}} = \frac{[\text{C}][\text{D}]}{[\text{A}][\text{B}]} \quad \Delta G = 0 \qquad \textbf{(10.9)}$$

Cuando esta reacción no está en equilibrio, se observa una relación diferente de productos a sustratos, y el cambio de energía libre de Gibbs se calcula con la ecuación 10.6:

$$\Delta G_{\text{reacción}} = \Delta G^{\circ\prime}_{\text{reacción}} + RT \ln \frac{[\text{C}][\text{D}]}{[\text{A}][\text{B}]} = \Delta G^{\circ\prime}_{\text{reacción}} + RT \ln Q$$
$$\left(\text{donde } Q = \frac{[\text{C}][\text{D}]}{[\text{A}][\text{B}]}\right) \qquad \textbf{(10.10)}$$

Q es la **relación de acción de masas**. La diferencia entre esta relación y la relación de productos a sustratos en el equilibrio determina el cambio de energía libre de Gibbs real para una reacción. En otras palabras, el cambio de energía libre es una medida de lo alejado del equilibrio que está operando un sistema de reacción. En consecuencia, ΔG y no $\Delta G^{\circ\prime}$ es el criterio para evaluar la espontaneidad de una reacción, y de este modo su dirección en un sistema biológico.

Las reacciones metabólicas pueden agruparse en dos tipos. Sea Q la relación de concentraciones de producto y reactivo en estado estable en una célula viva. Las reacciones en las que Q es cercana a K_{eq} se llaman **reacciones cercanas al equilibrio**. Los cambios de energía libre correspondientes a las reacciones cercanas al equilibrio son pequeños, por lo que esas reacciones son fácilmente reversibles. Las reacciones en las que Q está lejos de K_{eq} se llaman **reacciones metabólicamente irreversibles**. Esas reacciones están muy desplazadas del equilibrio, y Q suele diferir de K_{eq} en dos o más órdenes de magnitud. Así, ΔG es un número negativo grande para reacciones metabólicamente irreversibles.

Cuando cambia el flujo por una ruta, las concentraciones intracelulares de los metabolitos varían. En la mayor parte de los casos el cambio de concentración no es más que al doble o al triple. La mayor parte de las enzimas en una ruta catalizan reacciones cercanas al equilibrio, y tienen la actividad suficiente para restaurar con rapidez las concentraciones de sustratos y productos a un estado cercano al equilibrio. Pueden adaptarse a flujos en cualquier dirección.

En contraste, las actividades de enzimas que catalizan las reacciones metabólicamente irreversibles suelen ser insuficientes para llegar a estados cercanos al equilibrio para las reacciones. Las reacciones metabólicamente irreversibles son, en general, los puntos de control de rutas, y las enzimas que catalizan esas reacciones suelen estar reguladas de alguna manera. Las reacciones metabólicamente irreversibles pueden funcionar como cuellos de botella en el tráfico metabólico, ayudando a controlar el flujo por las reacciones más adelante en la ruta.

Las reacciones cercanas al equilibrio no suelen ser puntos adecuados de control. El flujo por un paso cercano al equilibrio no puede aumentarse en forma apreciable, porque ya está trabajando bajo condiciones en las que los productos y los reactivos están cercanos a los valores de equilibrio. La dirección de las reacciones cercanas al equilibrio puede controlarse mediante cambios en concentraciones de sustrato y producto. En contraste, el flujo a través de reacciones metabólicamente irreversibles se afecta en forma poco relativa por los cambios de concentración de metabolitos; el flujo por estas reacciones se debe controlar, modulando la actividad de la enzima.

Debido a que hay tantas reacciones metabólicas que son reacciones cercanas al equilibrio, se ha optado por no presentar todos los valores individuales de $\Delta G^{\circ\prime}$ en las descripciones. Por ejemplo, aunque muchos libros de texto indican los valores de $\Delta G^{\circ\prime}$ para las 10 reacciones de la glicólisis, todas ellas, menos tres, tienen valores de ΔG muy cercanos a cero en las células.

10.6 Energía libre del ATP

El ATP contiene un éster de fosfato, formado por el enlace del grupo α-fosforilo y el oxígeno 5′ de la ribosa y dos fosfoanhídridos formados por enlaces α, β y β, γ entre grupos fosforilo (figura 10.9). El ATP es un donador de varios grupos metabólicos, por lo regular un grupo fosforilo, que deja ADP, o un grupo nucleotidilo (AMP), y quedando el pirofosfato inorgánico PP_i. En las dos reacciones se requiere la ruptura de un enlace de fosfoanhídrido. Los diversos grupos de ATP suelen transferirse a aceptores distintos de agua. Sin embargo, las reacciones hidrolíticas permiten conocer estimaciones útiles de los cambios de energía libre de Gibbs que entran en juego. La tabla 10.1 es una lista de las energías libres de Gibbs estándar de hidrólisis ($\Delta G^{\circ\prime}_{\text{hidrólisis}}$) para ATP y AMP, y la figura 10.9 muestra la ruptura hidrolítica de cada uno de los fosfoanhídridos del ATP. Nótese en la tabla 10.1 que aunque la ruptura del fosfoéster en AMP sólo libera 13 kJ mol^{-1} bajo condiciones estándar, la ruptura de cualquiera de los fosfoanhídridos en ADP o ATP libera al menos 30 kJ mol^{-1} bajo condiciones estándar.

En la sección 7.3 se describieron la estructura y las funciones de los nucleósidos trifosfatos.

En la tabla 10.1 se muestra el cambio de energía libre de Gibbs estándar para la hidrólisis de pirofosfato. Todas las células contienen una enzima llamada pirofosfatasa, que cataliza esta reacción. La concentración celular de pirofosfato se mantiene en valores muy bajos, como consecuencia de esta reacción, que es muy favorable. Eso quiere

Figura 10.9 ▶
Hidrólisis de ATP a (1) ADP y fosfato inorgánico (P_i), y (2) AMP y pirofosfato inorgánico (PP_i).

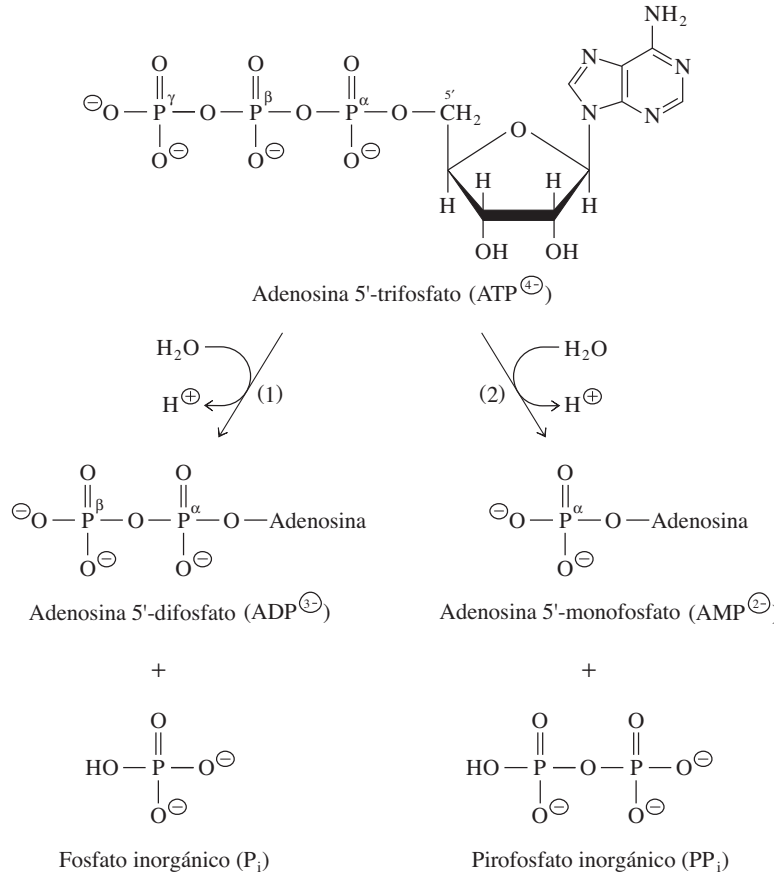


TABLA 10.1 Energías libres de Gibbs estándar para hidrólisis de ATP, AMP y pirofosfato

Reactivos y productos	$\Delta G^{\circ\prime}_{\text{hidrólisis}}$ (kJ mol^{-1})
$ATP + H_2O \rightarrow ADP + P_i + H^{\oplus}$	−32
$ATP + H_2O \rightarrow AMP + PP_i + H^{\oplus}$	−45
$AMP + H_2O \rightarrow Adenosine + P_i$	−13
$PP_i + H_2O \rightarrow 2\,P_i$	−29

P_i (fosfato inorgánico) = HPO_4^{2-}

PP_i (pirofosfato) = $HP_2O_7^{3-}$

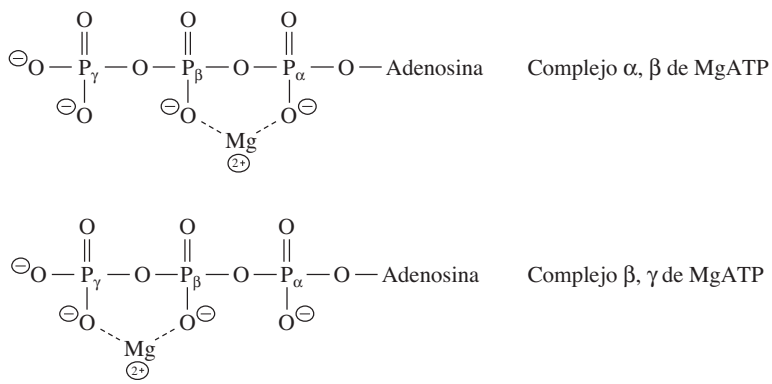
decir que la hidrólisis de ATP a AMP + pirofosfato siempre estará asociada a un cambio negativo de energía libre de Gibbs, aunque sea apreciable la concentración de AMP.

Los nucleósido disosfatos y trifosfatos, tanto en solución acuosa como en los sitios activos de enzimas, suelen estar en forma de complejos con iones magnesio (o a veces manganeso). Estos cationes se coordinan con los átomos de oxígeno de los grupos fosfato y forman anillos de seis miembros. Un ion magnesio puede formar varios y diferentes complejos con ATP; los complejos donde intervienen los grupos fosfato α y β, y los β y γ, se ven en la figura 10.10. La formación del complejo β, γ se favorece en soluciones acuosas. Más adelante se verá que también los ácidos nucleicos suelen estar acomplejados con iones contrarios, como Mg^{2+} o como proteínas catiónicas. Por comodidad se llamará adenosina trifosfato (ATP), guanosina trifosfato (GTP), citidina trifosfato (CTP) y uridina trifosfato (UTP) a los nucleósido trifosfatos, pero recuérdese que en realidad esas moléculas existen en las células en forma de complejos con Mg^{2+}.

En la sección 10.7C se describe otro ejemplo de la función del pirofosfato. A menudo, la hidrólisis de pirofosfato se cuenta como un equivalente de ATP en términos de energía monetaria.

Hay varios factores que contribuyen a la gran cantidad de energía liberada durante la hidrólisis de los enlaces de fosfoanhídrido en el ATP.

1. Repulsión electrostática entre los átomos de oxígeno con carga negativa, en los grupos de fosfoanhídrido del ATP, que es menor después de la hidrólisis. (En las células, $\Delta G^{\circ\prime}$hidrólisis disminuye en realidad, por la presencia de Mg^{2+}, con lo que se neutralizan parcialmente las cargas en los átomos de oxígeno del ATP, y baja la repulsión electrostática).
2. Los productos de la hidrólisis, ADP y fosfato inorgánico, o AMP y pirofosfato inorgánico, se solvatan mejor que el ATP mismo. Cuando los iones se solvatan, quedan eléctricamente apantallados entre sí. La disminución en la repulsión entre los grupos fosfato ayuda a impulsar la hidrólisis.



◀Figura 10.10
Complejos entre ATP y Mg^{2+}.

3. Los productos de la hidrólisis son más estables que el ATP. Los electrones en los átomos terminales de oxígeno están más deslocalizados que los que hay en los átomos de oxígeno de puentes. La hidrólisis del ATP reemplaza un átomo de oxígeno en puente con dos nuevos átomos de oxígeno terminales.

Debido al cambio de energía libre asociado a la ruptura de sus fosfoanhídridos, el ATP y otros nucleósido trifosfatos (UTP, GTP y CTP) con frecuencia se llaman **compuestos ricos en energía.** Todos los fosfoanhídridos de los nucleósido fosfatos tienen casi iguales energías libres estándar de hidrólisis. En ocasiones se expresa el consumo o la formación de los enlaces de fosfoanhídrido de los nucleósido trifosfatos en términos de equivalentes de ATP.

En la sección 10.7A se presenta una definición cuantitativa de compuestos ricos en energía.

El ATP suele ser el donador de grupo fosforilo cuando se fosforilan los nucleósido monofosfatos y difosfatos. Por supuesto, las concentraciones intracelulares de los nucleósido mono-, di- y trifosfatos individuales son diferentes, dependiendo de las necesidades metabólicas. Por ejemplo, las concentraciones intracelulares de ATP son mucho mayores que las de desoxitimidina trifosfato (dTTP). El ATP interviene en muchas reacciones, en tanto que el dTTP tiene mucho menos funciones, y principalmente es un sustrato para la síntesis de ADN.

Una serie de cinasas (fosfotransferasas) cataliza las interconversiones de mono, di y trifosfatos de nucleósido. El grupo fosforilo setransfiere entre los fosfatos de nucleósido que tienen constantes de equilibrio cercanas a 1.0. Los nucleósido monofostato cinasas son un grupo de enzimas que catalizan la conversión de monofostato de nucleósido a nucleósidos difosfato. Por ejemplo, guanosina monofosfato (GMP) se convierte en guanosina difosfato (GDP) por acción de guanilato cinasa. GMP o su análogo desoxi, dGMP, es el aceptor de grupo fosforilo en la reacción, y el ATP o el dATP es el donador de grupo fosforilo.

$$\text{GMP} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{GDP} + \text{ADP} \qquad \textbf{(10.11)}$$

La nucleósido difosfato cinasa convierte nucleósidos difosfato en nucleósidos trifosfato. Esta enzima, presente en el citosol y en las mitocondrias de los eucariotas, es mucho menos específica que las nucleósido monofosfato cinasas. Todos los nucleósidos difosfato, independientemente de la base de purina o pirimidina, son sustratos de la nucleósido difosfato cinasa. Los nucleósidos monofosfato no son sustratos. Debido a su relativa abundancia, el ATP suele ser el donador de grupo fosforilo en las células:

$$\text{GDP} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{GTP} + \text{ADP} \qquad \textbf{(10.12)}$$

Aunque la concentración de ATP varía entre los tipos celulares, la concentración intracelular de ATP fluctúa poco entre determinada célula, y la suma de las concentraciones de adenina nucleótidos permanece casi constante. La concentración intracelular de ATP se mantiene en parte por la activación de adenilato cinasa, que cataliza la siguiente reacción, cercana al equilibrio:

$$\text{AMP} + \text{ATP} \rightleftharpoons 2\ \text{ADP} \qquad \textbf{(10.13)}$$

Cuando aumenta la concentración de AMP, éste puede reaccionar con ATP para formar dos moléculas de ADP. Estas moléculas de ADP se pueden convertir en dos moléculas de ATP. El proceso general es

$$\text{AMP} + \text{ATP} + 2\ \text{P}_\text{i} \rightleftharpoons 2\ \text{ATP} + 2\ \text{H}_2\text{O} \qquad \textbf{(10.14)}$$

Las concentraciones de ATP en las células son mayores que las de ADP o de AMP, y los cambios relativamente menores en la concentración de ATP pueden causar grandes cambios en las concentraciones de los di- y monofosfatos. La tabla 10.2 muestra los aumentos teóricos de [ADP] y [AMP] bajo condiciones en las que se consume el ATP, suponiendo que la concentración total de adenina nucleótido permanece en 5.0 mM. Nótese que cuando la concentración de ATP disminuye de 4.8 mM a 4.5 mM (disminución aproximada de 6%), la concentración de ADP aumenta 2.5 veces y la de AMP aumenta

TABLA 10.2 Cambios teóricos en concentraciones de adenina nucleótidos

ATP (mM)	ADP (mM)	AMP (mM)
4.8	0.2	0.004
4.5	0.5	0.02
3.9	1.0	0.11
3.2	1.5	0.31

[Adaptado de Newsholme, E. A. y Leech, A. R. (1986). Biochemistry for the Medical Sciences (New York: John Wiley & Sons). p. 315.]

EJEMPLO DE CÁLCULO 10.1 Cambio de energía libre de Gibbs

P: En un hepatocito de rata, las concentraciones de ATP, ADP y P_i son 3.4 mM, 1.3 mM y 4.8 mM, respectivamente. Calcular el cambio de energía libre de Gibbs para la hidrólisis de ATP en esta célula. ¿Cómo se compara con el cambio de energía libre estándar?

R: El cambio de energía libre de Gibbs real se calcula con la ecuación 10.10.

$$\Delta G_{\text{reacción}} = \Delta G^{\circ\prime}{}_{\text{reacción}} + RT \ln \frac{[\text{ADP}][\text{P}_i]}{[\text{ATP}]} = \Delta G^{\circ\prime}{}_{\text{reacción}} + 2.303\ RT \log \frac{[\text{ADP}][\text{P}_i]}{[\text{ATP}]}$$

Cuando de sustituyen los valores y constantes conocidos (expresando las concentraciones como valores molares), y suponiendo que el pH es 7.0 y la temperatura de 25 °C,

$$\Delta G = -32\,000\ \text{J mol}^{-1} + (8.315\ \text{J K}^{-1}\ \text{mol}^{-1})(298\ \text{K})\left[2.303 \log \frac{(1.3 \times 10^{-3})(4.8 \times 10^{-3})}{(3.4 \times 10^{-3})}\right]$$

$$\Delta G = -32\,000\ \text{J mol}^{-1} + (2480\ \text{J mol}^{-1})[2.303 \log(1.8 \times 10^{-3})]$$

$$\Delta G = -32\,000\ \text{J mol}^{-1} - 16\,000\ \text{J mol}^{-1}$$

$$\Delta G = -48\,000\ \text{J mol}^{-1} = -48\ \text{kJ mol}^{-1}$$

El cambio real de energía libre es alrededor de 1.5 veces el cambio de energía libre estándar.

cinco veces. De hecho, cuando las células tienen buen suministro de combustibles oxidables y de oxígeno, mantienen un balance de nucleótidos de adenina en el que el ATP está presente a una concentración estable de 2 a 10 mM. [ADP] es menor que 1 mM y [AMP] es todavía menor. Como se verá, tanto el ADP como el AMP son frecuentes moduladores alostéricos efectivos de algunos procesos metabólicos productores de energía. El ATP, cuya concentración es relativamente constante, por lo general no es un modulador importante bajo condiciones fisiológicas.

Una consecuencia importante de las concentraciones de ATP y sus productos de hidrólisis *in vivo* es que el cambio de energía libre de Gibbs para la hidrólisis de ATP es en realidad mayor que el valor estándar de –32 kJ mol^{-1}. Esto se ilustra en el recuadro de cálculos de ejemplo 10.1 usando concentraciones de ATP, ADP y P_i medidas en células de hígado de rata. El cambio calculado de energía libre de Gibbs se acerca al valor determinado en muchos otros tipos de células.

10.7 Funciones metabólicas del ATP

La energía producida por una reacción o proceso biológico, como la síntesis de X—Y en la ecuación 10.15, con frecuencia se acopla a una segunda reacción, como la hidrólisis de ATP. De otro modo, la primera reacción no sucedería en forma espontánea.

$$\begin{aligned} \text{X} + \text{Y} &\rightleftharpoons \text{X—Y} \\ \text{ATP} + \text{H}_2\text{O} &\rightleftharpoons \text{ADP} + \text{P}_i + \text{H}^{\oplus} \end{aligned} \qquad \textbf{(10.15)}$$

La suma de los cambios de energía libre de Gibbs para las reacciones acopladas debe ser negativa para que se efectúen esas reacciones. Eso no quiere decir que cada una de las reacciones individuales deba ser espontánea en forma aislada ($\Delta G < 0$). La ventaja de las reacciones acopladas es que la energía liberada en una de ellas puede usarse para

impulsar la otra, aun cuando esta última sea desfavorable por sí misma ($\Delta G > 0$). (Recuérdese que la capacidad de acoplar reacciones es una de las propiedades clave de las enzimas).

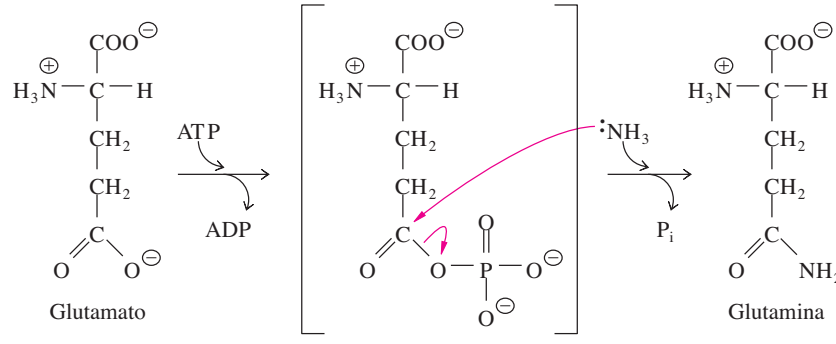
El flujo de energía en el metabolismo depende de muchas reacciones acopladas donde interviene el ATP. En muchos casos, las reacciones acopladas están vinculadas por un compuesto intermedio compartido, por ejemplo un derivado fosforilado del reactivo X.

$$\begin{aligned} X + ATP &\rightleftharpoons X{-}P + ADP \\ X{-}P + Y + H_2O &\rightleftharpoons X{-}Y + P_i + H^{\oplus} \end{aligned} \qquad \textbf{(10.16)}$$

La transferencia de un grupo fosforilo o de uno nucleotidilo a un sustrato lo activa (es decir, lo prepara para una reacción que tiene un cambio de energía libre de Gibbs grande y negativo). El compuesto activado (X—P) puede ser un metabolito o la cadena lateral de un residuo de aminoácido en el sitio activo de una enzima. Este intermedio reacciona entonces con un segundo sustrato para completar la reacción.

A. Transferencia de grupo fosforilo

La síntesis de glutamina a partir de glutamato y amoniaco ilustra la forma en que el ATP, compuesto rico en energía, impulsa una reacción de biosíntesis. Esta reacción, catalizada por glutamina sintetasa, permite que los organismos incorporen nitrógeno inorgánico a moléculas biológicas en forma de nitrógeno unido a carbono. En esta síntesis de un enlace de amida, el grupo carboxilo γ del sustrato se activa por la síntesis de un anhídrido intermedio.



(10.17)

La glutamina sintetasa cataliza el desplazamiento nucleofílico del grupo γ-fosforilo del ATP por el γ-carboxilato del glutamato. Se libera ADP y se produce γ-glutamilo fosfato unido a la enzima como intermedio rico en energía. El γ-glutamilo fosfato es inestable en solución acuosa, pero se protege contra el agua en el sitio activo de la glutamina sintetasa. En el segundo paso del mecanismo, el amoniaco actúa como nucleófilo y desplaza al fosfato (un buen grupo saliente) del carbono carbonílico del γ-glutamilo fosfato, para generar el producto glutamina. En total, una molécula de ATP se convierte en ADP + P_i por cada molécula de glutamina que se forma a partir de glutamato y amoniaco.

Se puede calcular el cambio de energía libre de Gibbs estándar para la reacción que no está acoplada a la hidrólisis de ATP.

$$\text{Glutamato} + NH_4^{\oplus} \rightleftharpoons \text{glutamina} + H_2O \qquad \textbf{(10.18)}$$

$$\Delta G^{\circ\prime}_{\text{reacción}} = +14 \text{ kJ mol}^{-1}$$

Este es un cambio de energía libre estándar, por lo que no necesariamente refleja el cambio real de energía libre de Gibbs para las concentraciones celulares de glutamato, glutamina

y amoniaco. La hipotética ecuación 10.18 podría estar relacionada con un cambio negativo de energía libre en el interior de la célula, si las concentraciones de glutamato y amoniaco fueran altas en relación con la concentración de glutamina. Pero ese no es el caso. Las concentraciones de glutamato y glutamina, en estado estable, deben mantenerse casi equivalentes, para soportar la síntesis de proteínas y otras rutas metabólicas. Eso quiere decir que el cambio de energía libre de Gibbs para la hipotética ecuación 10.18 no puede ser negativo. Además, la concentración de amoniaco es muy baja comparada con la de glutamato y glutamina. Tanto en bacterias como en eucariotas, el amoniaco debe ser incorporado en forma eficiente en la glutamina, aun cuando la concentración de amoniaco libre sea muy baja. Así, la ecuación 10.18 no es posible en las células vivas, porque debe haber una alta concentración de glutamina en estado estable, y porque hay un suministro limitado de amoniaco. La síntesis de la glutamina debe acoplarse con la hidrólisis de ATP para impulsarla en la dirección correcta.

La glutamina sintetasa cataliza una transferencia de grupo fosforilo, en la que el compuesto fosforilado es un intermedio transitorio (ecuación 10.17). Como ya se dijo, las cinasas catalizan la transferencia del grupo γ-fosforilo de ATP (o con menos frecuencia, de otro nucleósido trifosfato) a otro sustrato. En el caso típico, las cinasas catalizan reacciones metabólicamente irreversibles. Sin embargo, algunas reacciones de cinasa, como las catalizadas por adenilato cinasa (ecuación 10.13) y la creatina cinasa (sección 10.7B) son reacciones cercanas al equilibrio. Aunque las reacciones que catalizan se describen a veces como reacciones de transferencia de grupo fosfato, en realidad las cinasas transfieren un grupo fosforilo ($—PO_3^{2-}$) a sus aceptores.

La capacidad de un compuesto fosforilado para transferir su (o sus) grupos fosforilo se llama **potencial de transferencia de grupo fosforilo**, o simplemente potencial de transferencia de grupo. Algunos compuestos, como los fosfoanhídridos, son excelentes donadores de grupos fosforilo. Si tienen un potencial de transferencia de grupo igual o mayor que el del ATP, esos compuestos se consideran ricos en energía, o compuestos de alta energía. Otros compuestos, como los fosfoésteres, son malos donadores de grupo fosforilo. Tienen un potencial de transferencia de grupo menor que el del ATP, y se llaman compuestos de baja energía. Bajo condiciones estándar, los potenciales de transferencia de grupo tienen los mismos valores que las energías libres estándar de hidrólisis (tabla 10.3), pero de signo contrario. Así, el potencial de transferencia de grupo es una medida de la energía libre que se requiere para formar el compuesto fosforilado. Con frecuencia, una cinasa cataliza la transferencia de un grupo fosforilo desde un donador excelente al ADP, para formar ATP, que a continuación funciona como donador para una reacción diferente, catalizada por cinasa.

TABLA 10.3 Energías libres de Gibbs estándar para hidrólisis de metabolitos comunes

Metabolito	$\Delta G^{\circ\prime}_{\text{hidrólisis}}$ (kJ mol^{-1})
Fosfoenolpiruvato	−62
1,3-*Bi*fosfoglicerato	−49
ATP a AMP + PP_i	−45
Fosfocreatina	−43
Fosfoarginina	−32
Acetil-CoA	−32
ATP a ADP + P_i	−32
Pirofosfato	−29
Glucosa1-fosfato	−21
Glucosa 6-fosfato	−14
Glicerol 3-fosfato	−9

B. Producción de ATP por transferencia de grupo fosforilo

Los metabolitos con altos potenciales de transferencia de grupo fosforilo, incluyendo los anhídridos de ácido carboxílico y fosfato, pueden donar un grupo fosforilo como ADP para formar ATP. Algunos de esos compuestos ricos en energía son intermedios en rutas catabólicas; otros son compuestos de almacenamiento de energía. La figura 10.11 de la página siguiente ilustra el potencial de transferencia de grupo para varios compuestos, comparada con la de ATP.

El fosfoenolpiruvato es un compuesto intermedio en la ruta glucolítica, y tiene el mayor potencial de transferencia de grupo fosforilo que se conoce. La energía libre estándar de la hidrólisis de fosfoenolpiruvato es –62 kJ mol^{-1}. La energía libre de la hidrólisis para el fosfoenolpiruvato se puede comprender si se imagina que la molécula es un enol cuya estructura está trabada por la fijación del grupo fosforilo. Cuando se elimina el grupo fosforilo, la molécula forma, de modo espontáneo, el tautómero ceto, mucho más estable (figura 10.12). La transferencia del grupo fosforilo desde el fosfoenolpiruvato al ADP se cataliza por la enzima piruvato cinasa. Como la $\Delta G^{\circ\prime}$ de la reacción es aproximadamente –30 kJ mol^{-1}, el equilibrio para esta reacción, bajo condiciones estándar, está muy alejado en la dirección de transferencia del grupo fosforilo del fosfoenolpiruvato al ADP. En las células, esta reacción, metabólicamente irreversible, es una fuente importante de ATP.

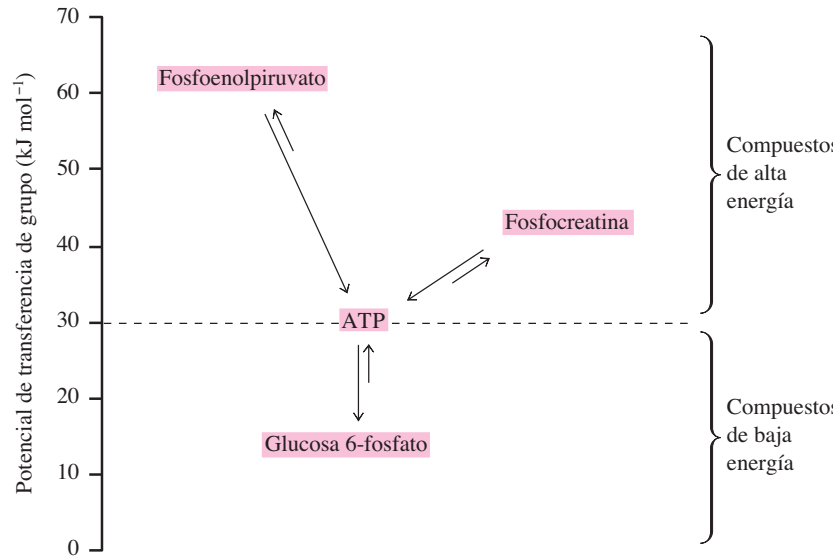
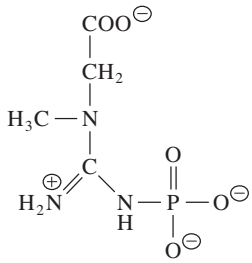
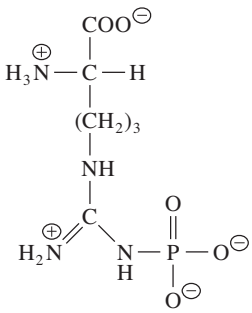


Figura 10.11 ▶
Potenciales relativos de transferencia de grupo fosforilo. Un compuesto con alto potencial de transferencia (es decir, un valor negativo grande de $\Delta G^{\circ\prime}_{\text{hidrólisis}}$) puede donar su grupo fosforilo a un compuesto que sea menos rico en energía. Las flechas de reacción indican la dirección predominante de la transferencia de grupo fosforilo bajo condiciones estándar.



Fosfocreatina



Fosfoarginina

Los **fosfágenos**, incluyendo la fosfocreatina y la fosfoarginina, son moléculas de almacenamiento de fosfato, ricas en energía, que se encuentran en las células musculares animales. Los fosfágenos son las fosfoamidas (más que fosfoanhídridos) y tienen mayores potenciales de transferencia de grupo que el ATP. En los músculos de los vertebrados se forman grandes cantidades de fosfocreatina mientras haya amplio suministro de ATP. En el músculo en reposo, la concentración de fosfocreatina es más o menos cinco veces mayor que la de ATP. Cuando bajan las concentraciones de ATP, la creatina cinasa cataliza el rápido reemplazo de ATP mediante la transferencia del grupo fosforilo activado desde fosfocreatina a ADP.

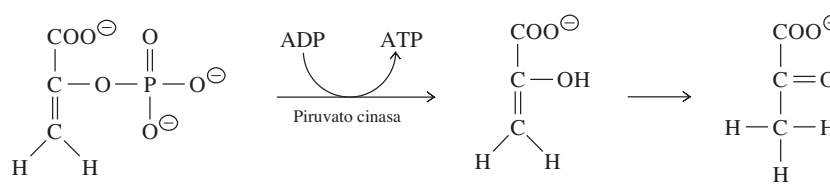
$$\text{Fosfocreatina} + \text{ADP} \overset{\text{Creatina cinasa}}{\rightleftharpoons} \text{Creatina} + \text{ATP} \qquad \textbf{(10.19)}$$

El suministro de fosfocreatina es adecuado para explosiones de actividad durante tres a cuatro segundos, duración suficiente para que otros procesos metabólicos comiencen a restaurar el suministro de ATP. Bajo condiciones celulares, la reacción de creatina cinasa es cercana al equilibrio. En muchos invertebrados, sobre todo en moluscos y artrópodos, la fosfoarginina es la fuente del grupo fosforilo activado.

Ya que el ATP tiene potencial intermedio de transferencia de grupo fosforilo (tabla 10.3 y figura 10.11), está bien adaptado en forma termodinámica para ser un portador de grupos fosforilo. El ATP también es cinéticamente estable bajo las condiciones fisiológicas, hasta que una enzima lo activa, y entonces puede llevar energía potencial química de una enzima a otra, sin hidrolizarse. No es de sorprender que el ATP sea el mediador de la mayor parte de las transferencias de energía química en todos los organismos.

C. Transferencia del grupo nucleotidilo

La otra reacción frecuente de transferencia de grupo donde interviene el ATP es la transferencia del grupo nucleotidilo. Un ejemplo es la síntesis de la acetil-CoA, catalizada



Fosfoenolpiruvato Enolpiruvato Piruvato

Figura 10.12 ▶
Transferencia del grupo fosforilo del fosfoenolpiruvato al ADP.

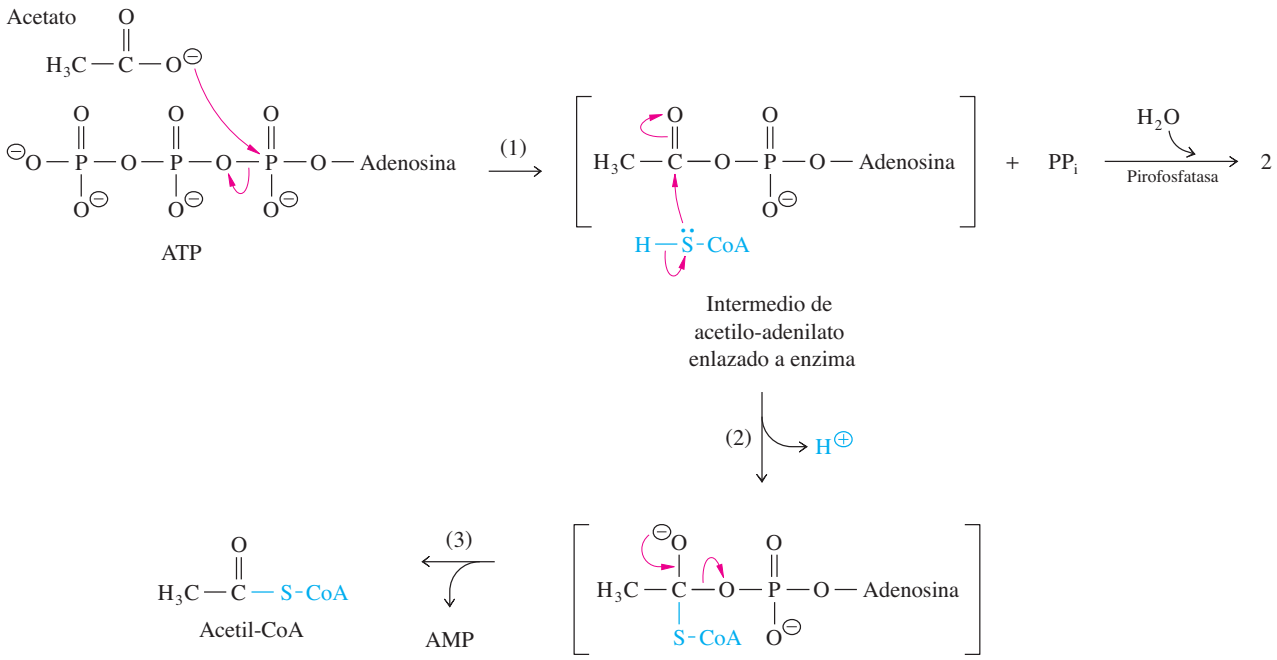


Figura 10.13 ▲
Síntesis de acetil-CoA a partir de acetato, catalizada por acetil-CoA sintetasa.

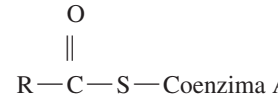
por la acetil-CoA sintetasa. En esta reacción, la parte de AMP en el ATP se transfiere al grupo carboxilato del acetato, que es nucleofílico, para formar un intermedio de acetilo-adenilato (figura 10.13). Nótese que se libera pirofosfato (PP_i) en este paso. Como el intermedio de glutamilo-fosfato de la ecuación 10.17, el intermedio reactivo se protege contra la hidrólisis no enzimática, uniéndose fuertemente dentro del sitio activo de la enzima. La reacción se completa con la transferencia del grupo acetilo al átomo nucleofílico de azufre, de la coenzima A, llevando a la formación de acetil CoA y de AMP.

La síntesis de la acetil CoA también ilustra la forma en que la eliminación de un producto puede hacer que una reacción metabólica llegue a la terminación, igual que la formación de un precipitado o de un gas puede impulsar a una reacción inorgánica a su terminación. La energía libre de Gibbs estándar para la formación de acetil-CoA a partir de acetato y de CoA es alrededor de —13 kJ mol^{-1} ($\Delta G^{\circ\prime}_{\text{hidrólisis}}$ de acetil-CoA = –32; $\Delta G^{\circ\prime}_{\text{hidrólisis}}$ de ATP a AMP = –45). Sin embargo, obsérvese que el producto PP_i se hidroliza y forma dos moléculas de P_i por acción de la pirofosfatasa (sección 10.6). Casi todas las células tienen altos niveles de actividad de esta enzima, y entonces la concentración de PP_i en las células en general es muy baja (menos de 10^{-6} M). La escisión del PP_i contribuye al valor negativo del cambio de energía libre de Gibbs estándar para la reacción total. La reacción adicional de hidrólisis se suma al costo de energía de un enlace de fosfoanhídrido al proceso sintético total. La hidrólisis del pirofosfato acompaña a muchas reacciones de síntesis en el metabolismo.

10.8 Los tioésteres tienen grandes energías libres de hidrólisis

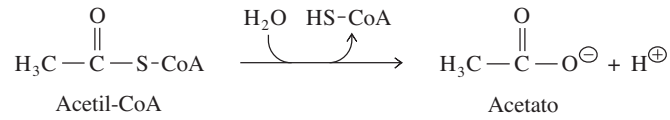
Los tioésteres son otra clase de compuestos ricos en energía. La acetil-CoA, que ocupa una posición central en el metabolismo, es un ejemplo (figuras 10.5 y 10.6). Se puede usar la gran energía de los tioésteres para generar equivalentes de ATP, o para transferir los grupos acilo a moléculas aceptoras. Recuérdese que los grupos acilo están unidos a

la coenzima A (o una proteína transportadora de acilo) mediante un enlace de tioéster (sección 7.6 y figura 10.13).



(10.20)

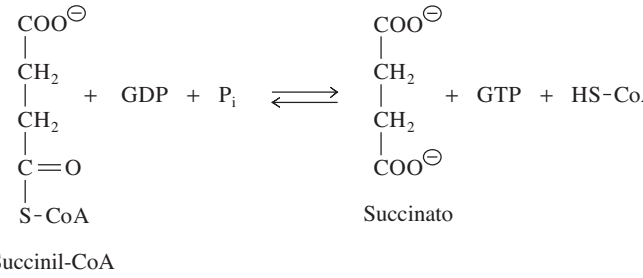
A diferencia de los ésteres oxigenados de los ácidos carboxílicos, la reactividad de los tioésteres se parece a la de los anhídridos de ácido oxigenado. El azufre está en el mismo grupo de la tabla periódica que el oxígeno; sin embargo, los tioésteres son menos estables que los ésteres oxigenados, por los electrones no compartidos del átomo de azufre, que no están deslocalizados de manera tan efectiva en un tioéster como los electrones no compartidos en un éster oxigenado. La energía asociada al enlace de tioéster se parece a la de cada uno de los enlaces de fosfoanhídrido del ATP. El cambio de energía libre de Gibbs estándar para la hidrólisis de la acetil-CoA es –31 kJ mol^{-1}.



(10.21)

A pesar de su gran energía de hidrólisis, un tioéster de CoA resiste la hidrólisis no enzimática a valores de pH neutro. En otras palabras, es cinéticamente estable en ausencia de los catalizadores adecuados.

La alta energía de un tioéster de CoA se usa en el quinto paso del ciclo del ácido cítrico, cuando la tioéster succinil-CoA reacciona con GDP (o a veces con ADP) y P_i, para formar GTP (o ATP).



(10.22)

En la sección 13.4, parte 5, se describirá la succinil-CoA sintetasa y en la sección 16.1, la síntesis de ácidos grasos.

La fosforilación a nivel de sustrato conserva la energía usada en la formación de succinil-CoA en forma de equivalentes de ATP. La energía del enlace de tioéster también impulsa la síntesis de ácidos grasos.

10.9 Conservación de energía de las oxidaciones biológicas mediante coenzimas reducidas

Las coenzimas reducidas son otra clase de compuestos ricos en energía. Su alta energía (o poder reductor) se puede donar en reacciones de óxido-reducción. La energía de coenzimas reducidas puede representarse como equivalentes de ATP, ya que su oxidación se puede acoplar a la síntesis de ATP.

Según se describió en la sección 6.1C, la oxidación de una molécula debe acoplarse a la reducción de otra molécula. Una molécula que acepta electrones y se reduce es un agente oxidante. Una molécula que pierde electrones y se oxida es un agente reductor. La reacción neta de óxido-reducción es

$$A_{red} + B_{ox} \rightleftharpoons A_{ox} + B_{red} \qquad \textbf{(10.23)}$$

Los electrones liberados en las reacciones de oxidación biológica se transfieren, enzimáticamente, a agentes oxidantes, por lo general a piridina nucleótido ($NAD^{\oplus}$ o a

veces $NADP^{\oplus}$) una flavina coenzima (FMN o FAD) o ubiquinona (Q). Cuando se reducen $NAD^{\oplus}$ y $NADP^{\oplus}$ en reacciones catalizadas por deshidrogenasas, sus anillos de nicotinamida aceptan un ion hidruro (figura 7.8). Las deshidrogenasas son miembros de la clase de enzimas llamadas oxidorreductasas (sección 5.1). Como parece indicar ese nombre, las deshidrogenasas catalizan reacciones de oxidación-reducción donde el sustrato se oxida por eliminación de un átomo de hidrógeno o un ion hidruro. Un electrón se pierde cuando un átomo de hidrógeno (formado por un protón y un electrón) se elimina, y se pierden dos electrones cuando se pierde un ion hidruro (formado por un protón y dos electrones). (Recuérdese que la oxidación es la pérdida de electrones).

La NADH y la NADPH, junto con QH_2, aportan el poder reductor. La $FMNH_2$ y la $FADH_2$ son intermedios reducidos, unidos a enzima, en algunas reacciones de oxidación. Las coenzimas reducidas, NADH y NADPH, tienen estructuras similares y funciones parecidas en las reacciones de óxido-reducción.

En la sección 7.4 se describen las estructuras y funciones de $NAD^{\oplus}$ y $NADP^{\oplus}$; de FMN y FAD en la sección 7.5, y de ubiquinona en la sección 7.14.

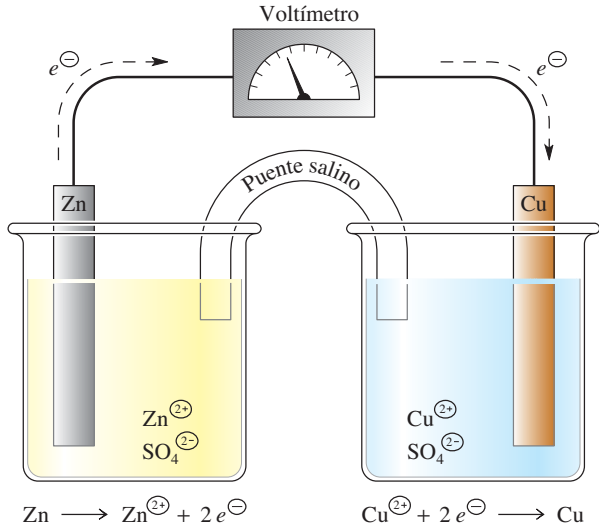
A. Relación entre el cambio de energía libre de Gibbs y el potencial de reducción

El **potencial de reducción** de un agente reductor es una medida de su reactividad termodinámica. El potencial de reducción se puede medir en celdas electroquímicas. Un ejemplo de una reacción simple de óxido-reducción es la transferencia de un par de electrones de un átomo de zinc (Zn) a un ion cobre (Cu^{2+}).

$$Zn + Cu^{2+} \rightleftharpoons Zn^{2+} + Cu \qquad \textbf{(10.24)}$$

Esta reacción se puede efectuar en dos soluciones aparte, que dividan la reacción total en dos semirreacciones (figura 10.14). En el electrodo de zinc, dos electrones son cedidos por cada átomo de zinc que reacciona (el agente reductor). Los electrones pasan por un alambre hasta el electrodo de cobre, donde reducen Cu^{2+} (el agente oxidante) hasta cobre metálico. Un puente salino, formado por un tubo con una partición porosa llena con electrolito, conserva la neutralidad eléctrica, proporcionando una trayectoria acuosa para el flujo de iones contrarios no reactivos entre las dos soluciones. El flujo de iones y el flujo de electrones están separados en una celda electroquímica. El flujo de electrones (es decir, energía eléctrica) se puede medir con un voltímetro.

La dirección de la corriente por el circuito de la figura 10.14 indica que el Zn se oxida con más facilidad que el Cu (es decir, el Zn es un reductor más enérgico que el Cu). La indicación del voltímetro representa una diferencia de potencial, la diferencia



◀Figura 10.14
Diagrama de una celda electroquímica. Los electrones pasan por el circuito externo, desde el electrodo de zinc hasta el electrodo de cobre. El puente salino permite el flujo de iones contrarios (en este ejemplo, iones sulfato) sin que haya mucha mezcla de las dos soluciones. La fuerza electromotriz se mide con el voltímetro conectado entre los dos electrodos.

entre el potencial de reducción de la reacción de la izquierda y la de la derecha. La diferencia medida de potencial es la **fuerza electromotriz**.

Es útil tener un patrón de referencia para mediciones de potenciales de reducción, igual que en las mediciones de cambios de energía libre de Gibbs. Para los potenciales de reducción, la referencia no sólo es un conjunto de condiciones de reacción, sino una semirreacción de referencia con la que se puedan comparar todas las demás semirreacciones. La semirreacción de referencia es la reducción de $H^{\oplus}$ a hidrógeno gaseoso (H_2). El potencial de reducción de esta semirreacción, bajo condiciones estándar ($E°$) se iguala arbitrariamente a 0.0 V. El potencial estándar de reducción de cualquier otra semirreacción se mide con una reacción acoplada de óxido-reducción, donde la media celda de referencia contiene una solución de $H^{\oplus}$ 1M y H_2 (gas) a 1 atm; la media celda de la muestra contiene cada una de las especies oxidadas y reducidas de la sustancia cuyo potencial de oxidación se va a determinar a la concentración de 1M. Bajo condiciones estándar para mediciones biológicas, la concentración de iones hidrógeno en la media celda de la muestra es 10^{-7} M (pH 7.0). El voltímetro a través del par de óxido-reducción mide la fuerza electromotriz, o diferencia en el potencial de reducción, entre las semirreacciones de referencia y de la muestra. Como el potencial estándar de reducción de la semirreacción de referencia es 0.0 V por definición, el potencial medido es el de la semirreacción de la muestra.

La tabla 10.4 muestra los potenciales estándar de reducción a pH 7.0 ($E°'$) de algunas semirreacciones de importancia biológica. Los electrones fluyen en forma espontánea de la sustancia que se oxida con más facilidad (la que tiene el potencial de reducción más negativo) hacia la sustancia que se reduce con más facilidad (la que tiene el potencial de reducción más positivo). Por consiguiente, los potenciales más negativos se asignan a sistemas de reacción que tienen mayor tendencia a donar electrones (es decir, los sistemas que tienden a oxidarse con más facilidad).

El potencial de reducción estándar para la transferencia de electrones de una especie molecular a otra se relaciona con el cambio de energía libre estándar para la reacción de óxido-reducción, con la ecuación

$$\Delta G°' = -n\mathcal{F}\Delta E°' \qquad \textbf{(10.25)}$$

donde n es la cantidad de electrones transferidos y $\mathcal{F}$ es la constante de Faraday, 96.48 kJ V^{-1} mol^{-1}. Nótese que la ecuación 10.25 se parece a la ecuación 9.5, excepto que aquí se maneja el potencial de reducción, y no el potencial de membrana. $\Delta E°'$ se define como la diferencia, en volts, entre el potencial de reducción estándar del sistema aceptor de electrones, y el del sistema donador de electrones.

$$\Delta E°' = \Delta E°'_{\text{aceptor de electrones}} - \Delta E°'_{\text{donador de electrones}} \qquad \textbf{(10.26)}$$

Recuérdese, de la ecuación 1.13, que $\Delta G°' = -RT \ln K_{eq}$. Al combinar esta ecuación con la ecuación 10.25, se obtiene

$$\Delta E°' = \frac{RT}{n\mathcal{F}} \ln K_{eq} \qquad \textbf{(10.27)}$$

Bajo condiciones biológicas, los reactivos en un sistema no existen en las concentraciones estándar de 1 M. Igual que el cambio real de energía libre de Gibbs para una reacción, que se relaciona con el cambio de energía libre de Gibbs estándar mediante la ecuación 10.6, una diferencia observada en los potenciales de reducción (ΔE) se relaciona con la diferencia en potenciales de reducción estándar ($\Delta E°'$) por la ecuación de Nernst. Para la ecuación 10.23, la ecuación de Nernst es

$$\Delta E = \Delta E°' - \frac{RT}{n\mathcal{F}} \ln \frac{[A_{ox}][B_{red}]}{[A_{red}][B_{ox}]} \qquad \textbf{(10.28)}$$

TABLA 10.4 Potenciales de reducción estándar de algunas semirreacciones de importancia biológica

Semirreacción de reducción	$E^{\circ\prime}$ (V)
Acetil-CoA + CO_2 + $H^{\oplus}$ + $2e^{\ominus}$ → Piruvato + CoA	−0.48
Ferredoxina (espinaca), Fe^{3+} + $e^{\ominus}$ → Fe^{2+}	−0.43
$2H^{\oplus}$ + $2e^{\ominus}$ → H_2 (a pH 7.0)	−0.42
α-Cetoglutarato + CO_2 + 2 $H^{\oplus}$ + $2e^{\ominus}$ → Isocitrato	−0.38
Lipoílo deshidrogenasa (FAD) + 2 $H^{\oplus}$ + $2e^{\ominus}$ → Lipoílo deshidrogenasa ($FADH_2$)	−0.34
$NADP^{\oplus}$ + 2 $H^{\oplus}$ + $2e^{\ominus}$ → NADPH + $H^{\oplus}$	−0.32
$NAD^{\oplus}$ + 2 $H^{\oplus}$ + $2e^{\ominus}$ → NADH + $H^{\oplus}$	−0.32
Ácido lipoico + 2 $H^{\oplus}$ + $2e^{\ominus}$ → Ácido dihidrólipoico	−0.29
Glutatión (oxidado) + 2 $H^{\oplus}$ + $2e^{\ominus}$ → 2 Glutatión (reducido)	−0.23
FAD + 2 $H^{\oplus}$ + $2e^{\ominus}$ → $FADH_2$	−0.22
FMN + $2H^{\oplus}$ + $2e^{\ominus}$ → $FMNH_2$	−0.22
Acetaldehído + 2 $H^{\oplus}$ + $2e^{\ominus}$ → Etanol	−0.20
Piruvato + 2 $H^{\oplus}$ + $2e^{\ominus}$ → Lactato	−0.18
Oxaloacetato + 2 $H^{\oplus}$ + $2e^{\ominus}$ → Malato	−0.17
Citocromo b_5 (microsómico), Fe^{3+} + $e^{\ominus}$ → Fe^{2+}	0.02
Fumarato + 2 $H^{\oplus}$ + $2e^{\ominus}$ → Succinato	0.03
Ubiquinona (Q) + 2 $H^{\oplus}$ + $2e^{\ominus}$ → QH_2	0.04
Citocromo *b* (mitocondrial), Fe^{3+} + $e^{\ominus}$ → Fe^{2+}	0.08
Citocromo c_1, Fe^{3+} + $e^{\ominus}$ → Fe^{2+}	0.22
Citocromo *c*, Fe^{3+} + $e^{\ominus}$ → Fe^{2+}	0.23
Citocromo *a*, Fe^{3+} + $e^{\ominus}$ → Fe^{2+}	0.29
Citocromo *f*, Fe^{3+} + $e^{\ominus}$ → Fe^{2+}	0.36
Plastocianina, Cu^{2+} + $e^{\ominus}$ → Cu^{+}	0.37
$NO_3^{\ominus}$ + 2 $H^{\oplus}$ + $2e^{\ominus}$ → $NO_2^{\ominus}$ + H_2O	0.42
Fotosistema I (P700)	0.43
Fe^{3+} + $e^{\ominus}$ → Fe^{2+}	0.77
$^1/_2$ O_2 + 2 $H^{\oplus}$ + $2e^{\ominus}$ → H_2O	0.82
Fotosistema II (P680)	1.1

A 298 °K, la ecuación 10.28 se reduce a

$$\Delta E = \Delta E^{\circ\prime} - \frac{0.026}{n} \ln Q \qquad \textbf{(10.29)}$$

donde Q representa la relación de las concentraciones reales de las especies reducidas y oxidadas. Para calcular la fuerza electromotriz de una reacción bajo condiciones no estándar, se usa la ecuación de Nernst y se sustituyen las concentraciones reales de reactivos y productos. Téngase en cuenta que un valor positivo de ΔE indica que una reacción de óxido-reducción se puede efectuar en forma espontánea.

B. Energía libre por transferencia de electrones de NADH

$NAD^{\oplus}$ se reduce a NADH en reacciones acopladas, donde se transfieren electrones de un metabolito al $NAD^{\oplus}$. La forma reducida de la coenzima (NADH) se convierte en una fuente de electrones en otras reacciones de óxido-reducción. Los cambios de energía libre de Gibbs asociados a la reacción total de óxido-reducción, bajo condiciones estándar, se calculan con los potenciales estándar de reducción de las dos semirreacciones y mediante la ecuación 10.25. Por ejemplo, examínese la reacción donde el NADH se oxida y se reduce oxígeno molecular. Eso representa el cambio disponible de energía libre durante un transporte de electrones asociado a membrana. Esta energía libre se recupera en forma de síntesis de ATP (capítulo 14).

Las dos semirreacciones, de acuerdo con la tabla 10.4, son

$$NAD^{\oplus} + 2\,H^{\oplus} + 2\,e^{\ominus} \longrightarrow NADH + H^{\oplus} \qquad E^{\circ\prime} = -0.32\ V \qquad \textbf{(10.30)}$$

y

$$^{1}/_{2}O_2 + 2\,H^{\oplus} + 2\,e^{\ominus} \longrightarrow H_2O \qquad E^{\circ\prime} = 0.82\ V \qquad \textbf{(10.31)}$$

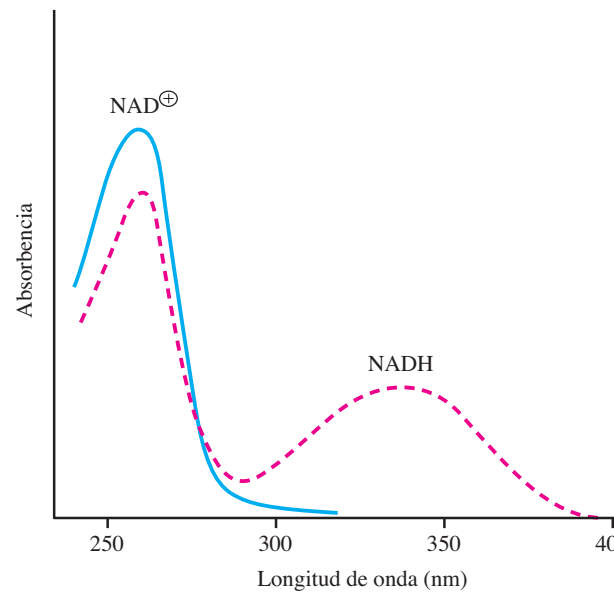
Ya que la semirreacción de $NAD^{\oplus}$ tiene el potencial estándar de reducción más negativo, el NADH es el donador de electrones y el oxígeno es el aceptor de electrones. La reacción neta es la ecuación 10.31 más la inversa de la ecuación 10.30.

$$NADH + {}^{1}/_{2}O_2 + H^{\oplus} \longrightarrow NAD^{\oplus} + H_2O \qquad \textbf{(10.32)}$$

RECUADRO 10.1 Diferencias en los espectros de absorción de $NAD^{\oplus}$ y NADH

Los distintos espectros de absorción de $NAD^{\oplus}$ y NADH tienen aplicación en trabajos experimentales. El $NAD^{\oplus}$ (y el $NADP^{\oplus}$) tienen máximo de absorción a 260 nm. Esta absorción se debe a las partes de adenina y de nicotinamida. Cuando se reduce el $NAD^{\oplus}$ a NADH (o el $NADP^{\oplus}$ a NADPH), la absorbencia a 260 nm disminuye, y aparece una banda de absorción centrada a 340 nm (figura adyacente). La banda de 340 nm se debe a la formación del anillo reducido de nicotinamida. Los espectros de $NAD^{\oplus}$ y NADH no cambian en el intervalo de pH de 2 a 10, donde tienen actividad la mayor parte de las enzimas. Además, hay pocas moléculas biológicas adicionales que tengan cambios en absorción de la luz cerca de los 340 nm.

En una valoración de enzima preparada en forma adecuada, se puede determinar la velocidad de formación de NADH si se mide un aumento de absorción a 340 nm. De igual modo, en una reacción con dirección opuesta, la rapidez de oxidación de NADH se indica con la rapidez de disminución de absorbencia a 340 nm. Muchas deshidrogenasas se pueden cuantificar en forma directa con este procedimiento. Además, las concentraciones de un producto que se forme en una reacción no oxidante se pueden determinar con frecuencia oxidando al producto en un sistema de deshidrogenasa-$NAD^{\oplus}$. Esa medición de concentraciones de $NAD^{\oplus}$ o NADH por su absorción de luz ultravioleta no sólo se usa en el laboratorio de investigación, sino también en muchos análisis clínicos.



▲Espectros de absorción ultravioleta de $NAD^{\oplus}$ y NADH.

y $\Delta E^{\circ\prime}$ para la reacción es

$$\Delta E^{\circ\prime} = E^{\circ\prime}_{O_2} - E^{\circ\prime}_{NADH} = 0.82\ V - (-0.32\ V) = 1.14\ V \quad \textbf{(10.33)}$$

Se aplica la ecuación 10.25:

$$\Delta G^{\circ\prime} = -(2)(96.48\ kJ\ V^{-1}\ mol^{-1})(1.14\ V) = -220\ kJ\ mol^{-1} \quad \textbf{(10.34)}$$

El cambio de energía libre de Gibbs estándar para la formación de ATP a partir de ADP + P_i es + 32 kJ mol^{-1}. (El cambio real de energía libre es mayor bajo las condiciones de la célula viva, como se hizo notar antes). La energía liberada durante la oxidación del NADH bajo las condiciones celulares basta para impulsar la formación de varias moléculas de ATP.

La cadena de transporte de electrones se examinará con detalle en el capítulo 14. En ese capítulo se examina la relación de NADH oxidada para ATP formado y se describen factores que afectan la relación.

10.10 Métodos experimentales para estudiar el metabolismo

La complejidad de muchas rutas metabólicas dificulta su estudio. Las condiciones de reacción que se usan con reactivos aislados en el tubo de ensayo (*in vitro*) con frecuencia son muy diferentes a las condiciones de reacción en la célula intacta (*in vivo*). El estudio de los eventos químicos del metabolismo es una de las ramas más antiguas de la bioquímica, y se han desarrollado muchos métodos para caracterizar las enzimas, compuestos intermedios, el flujo y la regulación de las rutas metabólicas.

Un método clásico para descubrir las rutas metabólicas es agregar un sustrato a preparaciones de tejidos, células o fracciones celulares, para entonces seguir la formación de compuestos intermedios y productos finales. El destino de un sustrato es más fácil de rastrear cuando éste se ha marcado en forma específica. Desde la llegada de la química nuclear, se han usado trazadores isotópicos para elaborar cartografías de las transformaciones de los metabolitos. Por ejemplo, los compuestos que contienen átomos de isótopos radiactivos, como ^3H o ^{14}C, se pueden añadir a células u otras preparaciones, y los compuestos radiactivos producidos por reacciones anabólicas o catabólicas se pueden purificar e identificar. Con espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) se pueden rastrear las reacciones de ciertos isótopos. También se puede emplear para estudiar el metabolismo de animales completos (incluyendo los humanos) y se usa en análisis clínicos.

Se puede lograr la verificación de los pasos de determinada ruta reproduciendo las reacciones por separado *in vitro*, usando sustratos y enzimas aislados. Se han aislado enzimas individuales casi para todos los pasos metabólicos conocidos. Al determinar la especificidad del sustrato y las propiedades cinéticas de una enzima purificada, es posible sacar algunas conclusiones acerca del papel regulador de esa enzima. Sin embargo, en una evaluación completa de la regulación de una ruta se requiere analizar las concentraciones de metabolito en la célula intacta, o en el organismo, bajo ciertas condiciones.

Se puede adquirir información valiosa estudiando mutaciones en genes aislados asociadas a la producción de formas inactivas o defectuosas de enzimas individuales. Aunque algunas mutaciones son letales y no se transmiten a generaciones siguientes, otras se pueden tolerar en los descendientes. Las investigaciones sobre organismos mutantes han ayudado a identificar enzimas y compuestos intermedios de numerosas rutas metabólicas. En forma peculiar, una enzima defectuosa causa deficiencia de su producto, y la acumulación de su sustrato, o de un producto derivado del sustrato a través de un ramal de ruta. Este método ha tenido gran éxito para identificar rutas metabólicas en organismos simples, como bacterias y levaduras. En los humanos, los defectos enzimáticos se manifiestan en enfermedades metabólicas. Se conocen cientos de enfermedades debidas a un solo gen. Algunas son extremadamente raras, y otras son bastante comunes; algunas son trágicas. En casos donde una alteración metabólica produce sólo síntomas

benignos, al parecer la red de reacciones metabólicas tiene bastantes traslapes y redundancias para permitir el desarrollo casi normal de los organismos.

En casos donde no se dispone de mutaciones naturales, se pueden generar organismos mutantes mediante tratamiento con radiaciones o mutágenos químicos (agentes que causan mutaciones). Se han caracterizado rutas enteras produciendo una serie de mutantes, aislándolos y examinando sus requerimientos nutricionales y metabolitos acumulados. En fecha más reciente, la mutagénesis dirigida al sitio (recuadro 6.1) ha demostrado su valor para definir las funciones de las enzimas. Los sistemas bacterianos y de levaduras han sido los que más se han usado para introducir mutaciones, porque se pueden cultivar grandes cantidades de esos organismos en un tiempo corto. Es posible producir modelos animales, en especial insectos y nematodos, donde no se expresen ciertos genes. También es posible eliminar ciertos genes en los vertebrados. Por ejemplo, los ratones con "genes eliminados" son un sistema experimental para investigar las complejidades del metabolismo de los mamíferos.

De igual manera, la investigación de las acciones de inhibidores metabólicos ha ayudado a identificar los pasos individuales en las rutas metabólicas. La inhibición de un paso de una ruta afecta a toda la ruta. Como se acumula el sustrato de la enzima inhibida, se puede aislar y caracterizar con más facilidad. También se acumulan los compuestos intermedios formados en pasos anteriores al sitio de inhibición. El uso de medicamentos inhibidores no sólo ayuda a estudiar el metabolismo, sino también determina el mecanismo de acción de la droga, que con frecuencia conduce a la obtención de variaciones mejoradas del medicamento.

Resumen

1. El nombre colectivo de las reacciones químicas que efectúan las células vivas es metabolismo. Las secuencias de reacciones se llaman rutas. Las rutas de degradación (catabólicas) y de síntesis (anabólicas) se hacen en pasos discretos.

2. Las rutas metabólicas se regulan para permitir que un organismo responda a demandas variables. Las enzimas individuales se regulan, normalmente, por modulación alostérica o por modificación covalente reversible.

3. Las rutas catabólicas principales convierten a las macromoléculas en metabolitos menores, productores de energía. La energía liberada en reacciones catabólicas se conserva en forma de ATP, GTP y coenzimas reducidas.

4. Dentro de una célula o de un organismo multicelular están secuestrados los procesos metabólicos.

5. Las reacciones metabólicas están en un estado estable, y no en el equilibrio. Las reacciones se efectúan en forma espontánea cuando el cambio de energía libre (ΔG) es negativo. La relación de concentraciones en equilibrio para una reacción depende de las concentraciones de los reactivos y los productos, por lo que el cambio real de energía libre (ΔG) difiere del cambio de energía libre estándar ($\Delta G^{\circ\prime}$).

6. La ruptura hidrolítica de los grupos fosfoanhídrido del ATP libera grandes cantidades de energía libre.

7. La energía del ATP se pone a disposición cuando se transfiere un grupo fosforilo terminal o un grupo nucleotidilo. Algunos metabolitos con altos potenciales de transferencia de grupo fosforilo pueden transferir sus grupos fosforilo al ADP, para producir ATP. Esos metabolitos se conocen como compuestos ricos en energía.

8. Los tioésteres, como la acil coenzima A, pueden donar grupos acilo y a veces también pueden generar equivalentes de ATP.

9. La energía libre de reacciones de oxidación biológica se puede capturar en forma de coenzimas reducidas. Esta forma de energía se mide como la diferencia en los potenciales de reducción.

10. Las rutas metabólicas se estudian caracterizando sus enzimas, compuestos intermedios, flujos y regulaciones.

Problemas

1. Una ruta de biosíntesis va del compuesto A al compuesto E, en cuatro pasos, y a continuación se ramifica. Una rama es una ruta de dos pasos a G, y la otra es una ruta de tres pasos a J. El sustrato A es un activador de acción anticipada para la enzima que cataliza la síntesis de E. Los productos G y J son inhibidores de retroalimentación para la enzima inicial en la ruta común, y también inhiben la primera enzima después del punto de separación de sus propias rutas.

a) Trace un diagrama que muestre la regulación de esta ruta metabólica.

b) ¿Por qué conviene a los dos productos que se inhiban dos enzimas en la ruta?

2. Se puede hacer la degradación de la glucosa mediante una combinación de las rutas glucolítica y de ácido tricarboxílico. Las enzimas para la glicólisis están en el citosol, en tanto que las enzimas para el ciclo del ácido tricarboxílico están en las mitocondrias. ¿Cuáles son dos ventajas de la separación de las enzimas para estas rutas principales de degradación de carbohidratos en distintos compartimientos celulares?

3. En las rutas metabólicas de varios pasos se pueden asociar entre sí las enzimas para los pasos sucesivos en complejos de multienzimas, o pueden estar enlazadas en posiciones muy cercanas en las membranas. Explique la ventaja principal de tener organizadas a las enzimas en cualquiera de estas asociaciones.

4. a) Calcule la K_{eq} a 25 °C y pH 7.0 para la reacción siguiente, usando los datos de la tabla 10.3.

$$\text{glicerol 3 fosfato} + H_2O \longrightarrow \text{Glicerol} + P_i$$

b) El paso final de la ruta de síntesis de glucosa a partir de lactato (gluconeogénesis) es

$$\text{Glucosa 6-P} + H_2O \longrightarrow \text{Glucosa} + P_i$$

Cuando la glucosa 6-P se incuba con la enzima adecuada, y la reacción procede hasta que se ha llegado al equilibrio, se encuentra que las concentraciones finales son: glucosa 6-P (0.035 mM), glucosa (100 mM) y P_i (100 mM). Calcule $\Delta G^{\circ\prime}$ a 25 °C y pH 7.0.

5. $\Delta G^{\circ\prime}$ para la hidrólisis de fosfoarginina es –32 kJ mol^{-1}.
a) ¿Cuál es el cambio real de energía libre para la reacción a 25 °C y pH 7.0 en el músculo de langostino en reposo, donde las concentraciones de fosfoarginina, arginina y P_i son 6.8 mM, 2.6 mM y 5 mM, respectivamente?
b) ¿Por qué este valor es distinto a $\Delta G^{\circ\prime}$?
c) Los compuestos de alta energía tienen energías libres negativas grandes de hidrólisis, lo que indica que sus reacciones con agua se efectúan casi hasta su terminación. ¿Cómo pueden existir concentraciones milimolares de acetil-CoA, cuya $\Delta G^{\circ\prime}_{\text{hidrólisis}}$ es –32 kJ mol^{-1} en las células?

6. El glucógeno se sintetiza a partir de glucosa-1-fosfato, que se activa por una reacción con UTP, formando UDP-glucosa y pirofosfato (PP_i). En la reacción glucosa-1-fosfato + UTP $\longrightarrow$ UDP-glucosa + PP_i, la UDP-glucosa es el sustrato para la enzima glucógeno sintasa, que adiciona moléculas de glucosa a la cadena creciente de carbohidratos. El valor de $\Delta G^{\circ\prime}$ para la condensación de UTP con glucosa-1-fosfato para formar UDP-glucosa es 0 kJ mol^{-1}, aproximadamente. El PP_i que se libera se hidroliza rápidamente por la pirofosfatasa inorgánica. Calcule el valor total de $\Delta G^{\circ\prime}$ si se acopla la formación de UDP-glucosa a la hidrólisis de PP_i.

7. a) Una molécula de ATP se suele consumir en menos de un minuto después de su síntesis, y el adulto humano promedio requiere unos 65 kg de ATP por día. Como el cuerpo humano sólo contiene unos 50 gramos de ATP y ADP combinados, ¿cómo es posible utilizar tanto ATP?
b) ¿Tiene el ATP una participación en el almacenamiento de energía?

8. La fosfocreatina se produce a partir de ATP y creatina en las células musculares de mamíferos en reposo. ¿Qué relación de ATP/ADP se necesita para mantener una relación de fosfocreatina/creatina de 20:1? (Para mantener en equilibrio las reacciones acopladas, el cambio real de energía libre debe ser cero).

9. Los aminoácidos se deben enlazar en forma covalente a un grupo hidroxilo de ribosa en el tARN (ARN de transferencia) correcto, antes de su reconocimiento e inserción en una cadena creciente de polipéptido. La reacción total se efectúa con las enzimas amino acilo tARN sintetasa, y es

$$\text{aminoácido} + \text{HO-tARN} + \text{ATP} \longrightarrow \text{Amino acilo-O-tARN} + \text{AMP} + 2\,P_i$$

Suponiendo que esta reacción se efectúa pasando por un adenilato de acilo intermedio, escriba todos los pasos que intervienen en esta reacción catalizada por enzima.

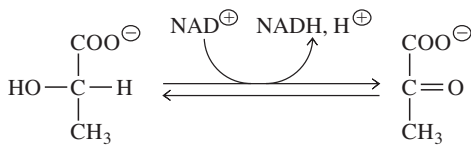
10. Cuando se incuba una mezcla de glucosa 6-fosfato y fructosa 6-fosfato con la enzima fosfohexosa isomerasa, la mezcla final contiene el doble de glucosa 6-fosfato que de fructosa 6-fosfato. Calcule el valor de $\Delta G^{\circ\prime}$.

$$\text{Glucosa 6-fosfato} \longleftrightarrow \text{fructosa 6-fosfato}$$

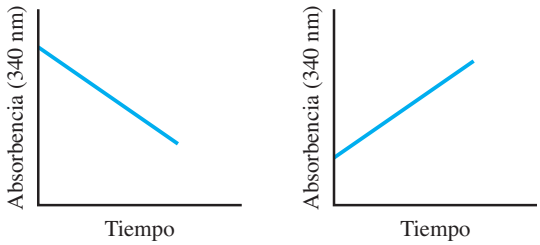
11. Con el acoplamiento de la hidrólisis de ATP a una reacción termodinámicamente desfavorable se puede desplazar mucho el equilibrio de la reacción.
a) Calcule K_{eq} para la reacción A → B, de biosíntesis, que es desfavorable desde el punto de vista de energía, cuando $\Delta G^{\circ\prime} = +25$ kJ mol^{-1} a 25 °C.
b) Calcule K_{eq} para la reacción A → B cuando se acopla a la hidrólisis de ATP. Compare este valor con el que obtuvo en la parte a).
c) Muchas células mantienen relaciones de [ATP]/[ADP] de 400 o más. Calcule la relación de [B] entre [A] cuando [ATP]:[ADP] es 400:1 y $[P_i]$ es constante a las condiciones estándar. ¿Cómo se compara esta relación con la relación de [B]/[A] en la reacción sin acoplar?

12. Con los datos de la tabla 10.4, escriba la reacción acoplada que se efectuaría en forma espontánea para los pares siguientes de moléculas bajo condiciones estándar:
a) Citocromo *f* y citocromo b_5.
b) Fumarato/succinato y ubiquinona/ubiquinol (Q/QH_2).
c) α-cetoglutarato/isocitrato y $NAD^{\oplus}$/NADH.

13. La lactato deshidrogenasa es una enzima dependiente de NAD que cataliza la oxidación reversible de lactato.



Con métodos espectrofotométricos se siguen las velocidades iniciales de reacción, a 340 nm, después de agregar lactato, $NAD^{\oplus}$, lactato deshidrogenasa y solución reguladora al recipiente de reacción. Cuando se vigila el cambio de absorbencia a 340 nm durante cierto tiempo, ¿cuál gráfica representa los resultados esperados? Explique por qué.



14. Use los datos de la tabla 10.4 para calcular el potencial estándar de reducción y el cambio de energía libre estándar para cada una de las reacciones de oxidación-reducción siguientes:

a) Ubiquinol (QH_2) + 2 citocromo $c(Fe^{3+}) \rightleftharpoons$ ubiquinona (Q) + 2 citocromo c (Fe^{2+}) + 2 $H^{\oplus}$

b) Succinato + $^1/_2O_2 \rightleftharpoons$ fumarato + H_2O

15. La citocromo oxidasa (C.O.) es el complejo proteínico final en la cadena de transporte de electrones que transfiere electrones de NADH al oxígeno. Se ha encontrado que muchos pacientes que padecen enfermedad de Alzheimer tienen formas mutantes de citocromo oxidasa en el tejido cerebral, que presentan poca actividad enzimática. Además, esos pacientes tienen un metabolismo de energía anormalmente bajo en el tejido cerebral que puede contribuir a la neurodegeneración. ¿Cómo podrían contribuir esas formas mutantes de C.O. a la producción defectuosa de energía en el cerebro?

16. Use los potenciales de reducción estándar para Q y FAD, de la tabla 10.4 para demostrar que la oxidación de $FADH_2$ por Q libera la energía suficiente para impulsar la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i bajo condiciones celulares, donde $[FADH_2] = 5$ mM, $[FAD] = 0.2$ mM, $[Q] = 0.1$ mM y $[QH2] = 0.05$ mM. Suponga que ΔG de la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i es $+30$ kJ mol^{-1}.

Lecturas seleccionadas

Edwards, R. A. (2001). The free energies of metabolic reactions (ΔG) are not positive. *Biochem. Mol. Biol. Ed*. 29:101-103.

Schmidt, S., Sunyaev, S., Bork, P. y Dandekar, T. (2003). Metabolites: a helping hand for pathway evolution? *Trends Biochem. Sci.* 28:336-341.

11

capítulo once

Glicólisis

Las tres primeras rutas metabólicas que se examinarán son básicas en el metabolismo de carbohidratos y en la generación de energía. La gluconeogénesis es la ruta principal en la síntesis de hexosas a partir de precursores con tres carbonos. Como indica el nombre de esta ruta, la glucosa es el producto final principal de la gluconeogénesis. La ruta biosintética se describirá en el capítulo siguiente. La glucosa y otras hexosas pueden ser los precursores en las síntesis de muchos carbohidratos complejos.

La glucosa también se puede degradar en una ruta glicolítica catabólica, con recuperación de la energía usada en su síntesis. En la glicólisis, tema de este capítulo, la glucosa se convierte en el piruvato, ácido de tres carbonos. El piruvato tiene varios destinos posibles, uno de los cuales es la descarboxilación oxidante para formar acetil-CoA. La tercera ruta es el ciclo del ácido cítrico, que se describirá en el capítulo 13. Este ciclo es la ruta por la cual el grupo acetilo de la acetil-CoA se oxida y forma dióxido de carbono y agua. Uno de los compuestos intermedios importantes en el ciclo del ácido cítrico es el oxalacetato, que también es un intermedio en la síntesis de la glucosa a partir de piruvato. La figura 11.1 muestra la relación entre las tres rutas. Todas ellas tienen una participación en la formación y la degradación de moléculas no derivadas de carbohidratos, como aminoácidos y lípidos.

En este libro se presentan las reacciones de glicólisis, gluconeogénesis y el ciclo del ácido cítrico con más detalle que las de otras rutas metabólicas, pero a todas las rutas se aplican los mismos principios. Se presentarán muchas biomoléculas y enzimas, algunas de las cuales aparecen en más de una ruta. Téngase en mente que las estructuras químicas de los metabolitos se mencionan en los nombres de las enzimas, y que los nombres de las enzimas reflejan la especificidad del sustrato y el tipo de reacción catalizada. Un dominio seguro de la terminología preparará al lector en su disfrute de la elegancia química del metabolismo. Sin embargo, no se pierdan de vista los conceptos principales y las estrategias generales del metabolismo cuando se memoricen los detalles. Los nombres de determinadas enzimas se podrían desvanecer en el tiempo, pero se espera que el lector mantenga una impresión de las pautas u objetivos después de la interconversión de los metabolitos en las células.

Arriba: Vino, cerveza y pan. Durante siglos, las vinaterías, cervecerías y panaderías han aprovechado la ruta bioquímica básica de la glicólisis, donde la glucosa se transforma en etanol y CO_2.

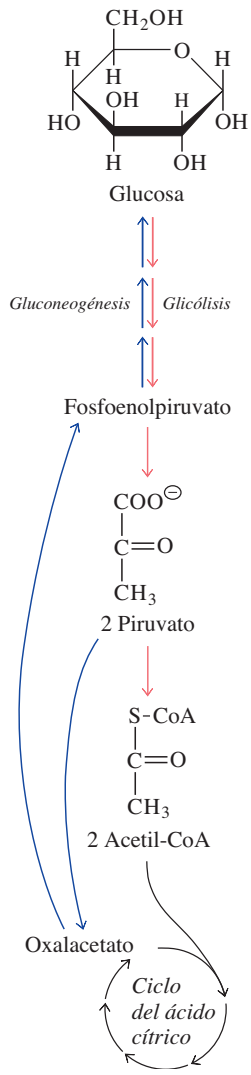


Figura 11.1 ▲
Gluconeogénesis, glicólisis y el ciclo del ácido cítrico. La glucosa se sintetiza a partir del piruvato pasando por oxalacetato y fosfoenolpiruvato. En la glicólisis, se degrada la glucosa a piruvato. Muchos de los pasos de la glicólisis (pero no todos), son la inversa de las reacciones de gluconeogénesis. El grupo acetilo del piruvato se transfiere a la coenzima A (CoA) y se oxida a dióxido de carbono por el ciclo del ácido cítrico. Se requiere energía en forma de equivalentes de ATP para la síntesis de la glucosa. Algo de esta energía se recupera en la glicólisis, pero mucho más se recupera como resultado del ciclo del ácido cítrico.

En este libro se seguirá la tradición de presentar la glicólisis como primera ruta metabólica. El catabolismo de la glucosa es una fuente principal de energía en los animales. Los detalles de las diversas reacciones, y su regulación, se conocen bien.

11.1 Reacciones enzimáticas de la glicólisis

La glicólisis es una secuencia de diez reacciones catalizadas por enzimas, con las que la glucosa se convierte en piruvato (figura 11.2, páginas 330-331). La conversión de una molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato se acompaña de la conversión neta de dos moléculas de ADP en dos moléculas de ATP y la producción de dos moléculas de NADH. La mayor parte de las enzimas de esta ruta se encuentra en todas las especies vivas, y están en el citosol. La ruta glicolítica es activa en todos los tipos celulares diferenciados en los organismos multicelulares. En algunas células de mamíferos (como las de la retina y algunas células cerebrales), es la única ruta de formación de ATP.

La reacción neta de la glicólisis se ve en la siguiente ecuación.

$$\text{Glucosa} + 2\ \text{ADP} + 2\ \text{NAD}^{\oplus} + 2\ \text{P}_i \rightarrow 2\ \text{Piruvato} + 2\ \text{ATP} + 2\ \text{NADH} + 2\ \text{H}^{\oplus} + 2\ \text{H}_2\text{O} \qquad \textbf{(11.1)}$$

La lista de las diez reacciones de la glicólisis se muestra en la tabla 11.1. Se puede dividir en dos etapas: la etapa de hexosa y la etapa de triosa. La página izquierda de la figura 11.2 muestra la fase de hexosa. En el paso 4, se rompe el enlace C-3—C-4 de fructosa 1,6-*bi*fosfato y en adelante los productos intermedios en la ruta son triosas fosfato. Se forman dos triosas fosfato a partir de 1,6-*bi*fosfato de fructosa. La dihidroxiacetona fosfato se convierte en gliceraldehído 3-fosfato en el paso 5, y el gliceraldehído 3-fosfato continúa por la ruta. Todos los pasos en adelante, en la etapa de triosa de la glicólisis (página derecha de la figura 11.2) son recorridos por dos moléculas, por cada molécula de glucosa metabolizada.

En la etapa de hexosa de la glicólisis, dos moléculas de ATP se convierten en ADP. En el paso de triosa se forman cuatro moléculas de ATP a partir de ADP por cada molécula de glucosa metabolizada. Así, la glicólisis tiene un rendimiento neto de dos moléculas de ATP por molécula de glucosa.

ATP consumido por glucosa:	2 (etapa de hexosa)	
ATP producido por glucosa:	4 (etapa de triosa)	
Producción neta de ATP por glucosa:	2	**(11.2)**

Las primera y tercera reacciones de la glicólisis se acoplan a la utilización del ATP. Estas reacciones de cebado ayudan a impulsar la ruta en la dirección de la glicólisis, porque las reacciones inversas se favorecen termodinámicamente en ausencia de ATP. Dos productos intermedios posteriores de la glicólisis tienen potenciales de transferencia de grupo suficientes para permitir la transferencia de un grupo fosforilo al ADP, produciendo ATP (pasos 7 y 10). El paso 6 se acopla a la síntesis de equivalentes reductores en forma de NADH. Cada molécula de NADH equivale a varias moléculas de ATP (sección 10.9), y la ganancia neta de energía en la glicólisis se debe principalmente a la producción de NADH.

11.2 Los diez pasos de la glicólisis catalizados por enzima

Ahora se examinará la química y las enzimas de cada reacción glicolítica, una por una. Al ir leyendo, póngase atención en la lógica química y en la economía de la ruta. Imagine cómo cada reacción química prepara a un sustrato para el siguiente paso en el proceso. Por ejemplo, nótese que una reacción de escisión convierte una hexosa en dos triosas, y no en un compuesto de dos carbonos y una tetrosa. Las dos triosas se interconvierten rápidamente y permiten que los dos productos de la reacción de escisión sigan

TABLA 11.1 Las reacciones y las enzimas de la glicólisis

1. Glucosa + ATP ⟶ Glucosa 6-fosfato + ADP + $H^{\oplus}$	Hexocinasa, glucocinasa
2. Glucosa 6-fosfato ⇌ Fructosa 6-fosfato	Glucosa 6-fosfato isomerasa
3. Fructosa 6-fosfato + ATP ⟶ Fructosa 1,6-*bi*fosfato + ADP + $H^{\oplus}$	Fosfofructocinasa-1
4. Fructosa 1,6-*bi*fosfato ⇌ Dihidroxiacetona fosfato + Gliceraldehído 3-fosfato	Aldolasa
5. Dihidroxiacetona fosfato ⇌ Gliceraldehído 3-fosfato	Triosa fosfato isomerasa
6. Gliceraldehído 3-fosfato + $NAD^{\oplus}$ + P_i ⇌ 1,3-*Bi*fosfoglicerato + NADH + $H^{\oplus}$	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
7. 1,3-*Bi*fosfoglicerato + ADP ⇌ 3-Fosfoglicerato + ATP	Fosfoglicerato cinasa
8. 3-Fosfoglicerato ⇌ 2-Fosfoglicerato	Fosfoglicerato mutasa
9. 2-Fosfoglicerato ⇌ Fosfoenolpiruvato + H_2O	Enolasa
10. Fosfoenolpiruvato + ADP + $H^{\oplus}$ ⇌ Piruvato + ATP	Piruvato cinasa

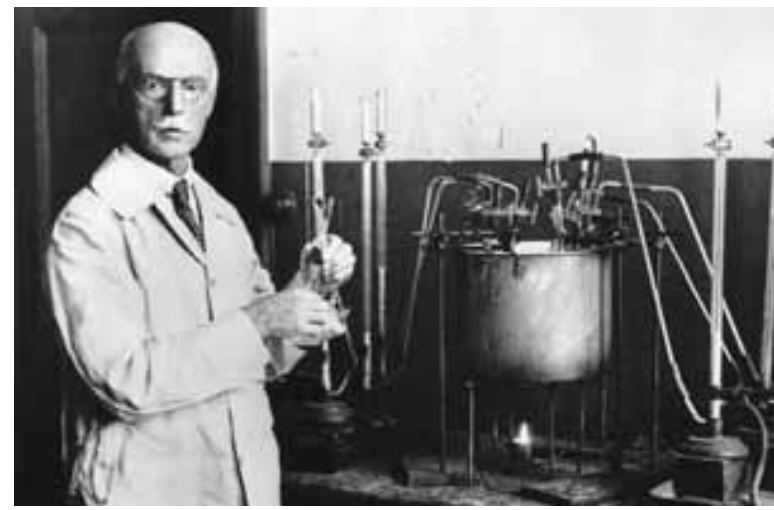
RECUADRO 11.1 Breve historia de la ruta glicolítica

La glicólisis fue una de las primeras rutas metabólicas en ser elucidadas. Desempeñó un importante papel en el desarrollo de la bioquímica. En 1897, Eduard Buchner (sección 1.1) descubrió que se liberaban burbujas de dióxido de carbono en una mezcla de sacarosa y un extracto de levadura, libre de células. Llegó a la conclusión de que había fermentación en su extracto de levadura libre de células. Más de 20 años antes, Louis Pasteur había demostrado que las células de la levadura fermentan azúcar y la convierten en alcohol (es decir, que producen etanol y CO_2), pero Buchner demostró que no se requerían células intactas. Buchner bautizó como zimasa a la actividad de fermentación. Hoy se sabe que la zimasa de los extractos de levadura no es una sola enzima, sino una mezcla de enzimas que en conjunto catalizan las reacciones de la glicólisis.

Los pasos de la ruta glicolítica se determinaron en forma gradual al analizar las reacciones catalizadas por extractos de levaduras o de músculos. En 1905, Arthur Harden y William John Young encontraron que cuando disminuye la velocidad de fermentación de glucosa por el extracto de levadura, se puede acelerar agregando fosfato inorgánico. Harden y Young supusieron que se formaban derivados de fosfato de glucosa. Lograron aislar fructosa 1,6-*bi*fosfato y demostraron que es un compuesto intermedio en la fermentación de la glucosa, porque también es fermentado por extractos de levadura libres de células. Se otorgó el Premio Nobel de Química en 1929 a Harden por su trabajo sobre la glicólisis.

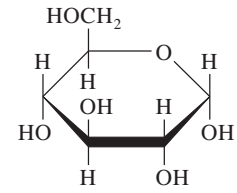
En la década de 1940 se conocía la ruta glicolítica completa en eucariotas, incluyendo sus enzimas, compuestos intermedios y coenzimas. La posterior caracterización de las enzimas individuales, y los estudios de la regulación de la glicólisis y su integración con otras rutas, ha durado muchos años más. En las bacterias, la ruta glicolítica clásica se llama ruta de Embden-Meyerhof-Parnas, por Gustav Embden (1874-1933), Otto Meyerhof (1884-1951) y Jacob Parnas (1884-1949). La ruta bacteriana es distinta de la ruta eucariótica por algunos detalles. En 1929 se otorgó a Meyerhof el Premio Nobel de Fisiología o Medicina por su trabajo sobre la producción de ácido láctico en las células musculares.

▲ Louis Pasteur (1822–1895).



▲ Arthur Harden (1865–1940).

Figura 11.2 ▶
Conversión de glucosa a piruvato por glicólisis. En el paso 4, la molécula de hexosa se rompe en dos y las reacciones restantes de la glicólisis se efectúan por dos moléculas de triosa. El ATP se consume en la etapa de hexosa, y se genera en la etapa de triosa.



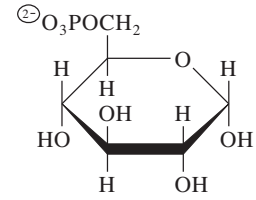
Glucosa

Transferencia de grupo fosforilo del ATP a la glucosa

① Hexocinasa, glucocinasa

ATP

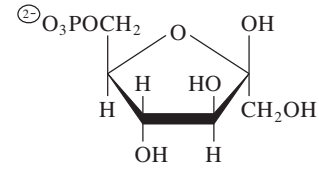
ADP



Glucosa 6-fosfato

Isomerización

② Glucosa 6-fosfato isomerasa



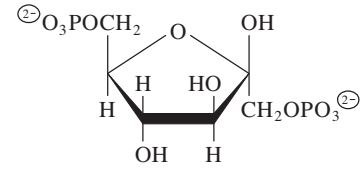
Fructosa 6-fosfato

Transferencia de un segundo grupo fosforilo del ATP a la fructosa 6-fosfato

③ Fosfofructocinasa-1

ATP

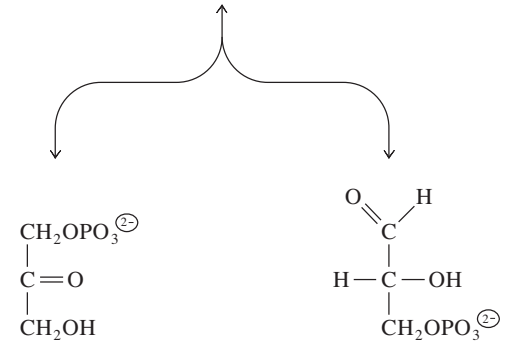
ADP



Fructosa 1,6-*bi*fosfato

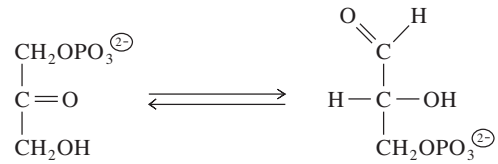
Ruptura del enlace C-3—C-4, formándose dos fosfatos de triosa

④ Aldolasa



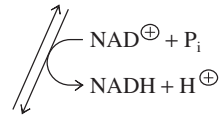
Dihidroxiacetona fosfato

Gliceraldehído 3-fosfato

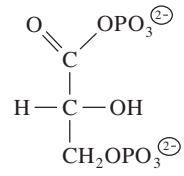


Dihidroxiacetona fosfato — Gliceraldehído 3-fosfato

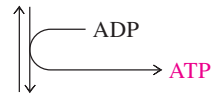
Triosa fosfato isomerasa (5) — *Interconversión rápida de triosas fosfato*



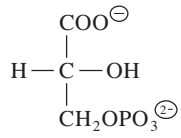
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (6) — *Oxidación y fosforilación; se produce un anhídrido de ácido mixto, de alta energía*



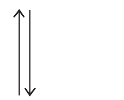
1,3-*Bi*fosfoglicerato



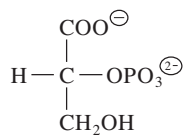
Fosfoglicerato cinasa (7) — *Transferencia de un grupo fosforilo de alta energía al ADP, formándose ATP*



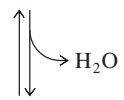
3-Fosfoglicerato



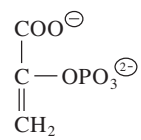
Fosfoglicerato mutasa (8) — *Transferencia intramolecular de grupo fosforilo*



2-Fosfoglicerato

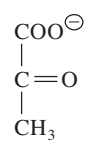


Enolasa (9) — *Deshidratación a un enol éster de alta energía*



Fosfoenolpiruvato

Piruvato cinasa (10) — *Transferencia de un grupo fosforilo de alta energía al ADP, formándose ATP*



Piruvato

siendo metabolizados por la acción de un conjunto de enzimas, y no por dos. Por último, se notará la manera en que se consume y se produce el ATP en la glicólisis. Ya se vieron varios ejemplos de la transferencia de energía potencial química del ATP (por ejemplo, en la sección 10.7), pero en este capítulo las reacciones son los primeros ejemplos detallados de la forma en que la energía liberada por reacciones de oxidación es capturada para usarla en otras rutas bioquímicas.

1. Hexocinasa

En la primera reacción de la glicólisis, el grupo γ-fosforilo del ATP se transfiere al átomo de oxígeno en el C-6 de la glucosa, formándose glucosa 6-fosfato y ADP (figura 11.3). Esta reacción de transferencia de grupo fosforilo es catalizada por hexocinasa. Las cinasas catalizan cuatro reacciones en la ruta glicolítica: los pasos 1, 3, 7 y 10.

En la sección 11.5 se describirán los detalles de la regulación de la glicólisis.

Se han estudiado detenidamente las hexocinasas de levaduras y tejidos animales. Esas enzimas tienen una amplia especificidad de sustratos; catalizan la fosforilación de glucosa y manosa, y de la fructosa cuando está presente en altas concentraciones. La hexocinasa de levadura sufre un cambio de conformación, de ajuste inducido, cuando se enlaza con glucosa (sección 6.5C).

En muchas células eucariotas se encuentran varias formas de hexocinasa, o **isozimas**. Las isozimas son proteínas diferentes de una especie que catalizan la misma reacción química. Por ejemplo, se han aislado cuatro isozimas de hexocinasa en hígados de mamíferos. Las cuatro se encuentran en proporciones variables en otros tejidos de mamíferos. Estas isozimas catalizan la misma reacción, pero tienen distintos valores de K_m para la glucosa. Las hexocinasas I, II y III tienen valores aproximados de K_m de 10^{-6} a 10^{-4} M, en tanto que la hexocinasa IV, llamada también glucocinasa, tiene un valor de K_m mucho mayor para la glucosa (aproximadamente 10^{-2} M). La concentración de glucosa en la sangre suele ser menor a la K_m de la glucocinasa para la glucosa, y a esas bajas concentraciones, las otras isozimas de hexocinasa catalizan la fosforilación de la glucosa. Cuando hay altas concentraciones, entra en acción la glucocinasa. Ya que la glucocinasa nunca se satura con glucosa, el hígado puede responder a grandes aumentos en la glucosa sanguínea, fosforilándola para que entre en la glicólisis o en la ruta de síntesis del glucógeno. Las hexocinasas I, II y III se inhiben alostéricamente a concentraciones fisiológicas de su producto intermedio, el glucosa 6-fosfato, pero la glucocinasa no.

En la sección 12.5 se explora la síntesis del glucógeno.

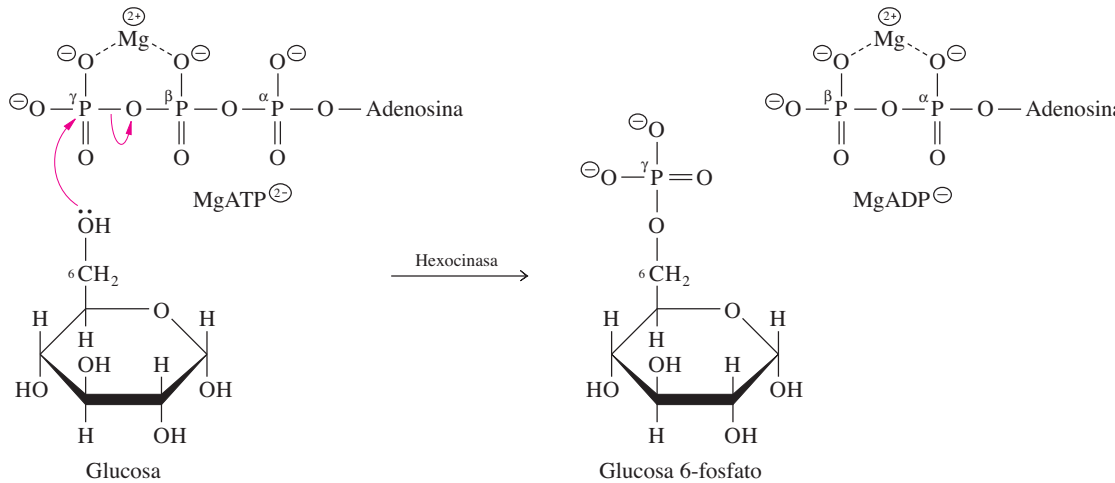


Figura 11.3 ▲
Reacción de transferencia del grupo fosforilo catalizada por hexocinasa. La reacción se efectúa por ataque del oxígeno en el hidroxilo C-6 de la glucosa sobre el γ-fósforo del $MgATP^{2-}$. Se desplaza al $MgADP^{-}$ y se genera glucosa 6-fosfato. Las cuatro cinasas en la glicólisis catalizan el ataque nucleofílico directo de un grupo hidoxilo al grupo fosforilo del ATP (su inversa, o ambas, bajo las condiciones celulares). (El Mg^{2+} que se muestra aquí en forma explícita también se requiere en las otras reacciones de cinasa que se mencionan en este capítulo, aunque en ellas no se muestra).

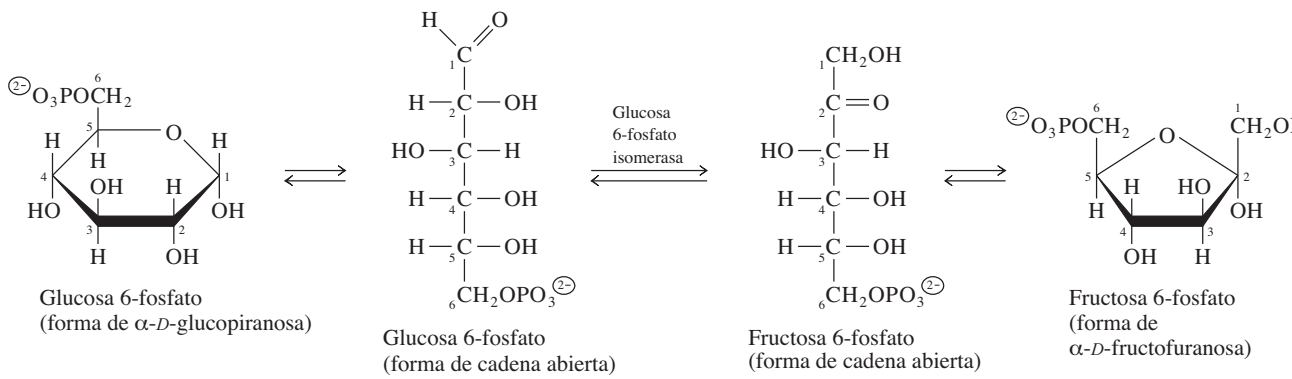


Figura 11.4 ▲
Conversión de glucosa 6-fosfato a fructosa 6-fosfato. La isomerización de aldosa-cetosa se cataliza con la glucosa 6-fosfato isomerasa.

En la mayor parte de las bacterias, la fosforilación de la glucosa para formar glucosa 6-fosfato la hace el sistema de transporte de azúcar fosfoenolpiruvato (sección 21.7B). La fosforilación se acopla al consumo de azúcar y el grupo fosforilo es donado por el fosfoenolpiruvato. Se pueden encontrar las hexocinasas y las glucocinasas en las bacterias, pero su papel en la glicólisis es secundario.

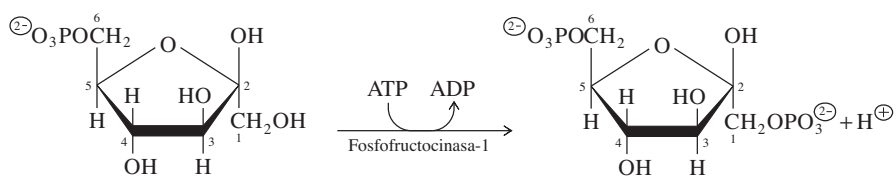
2. Glucosa 6-fosfato isomerasa

En el segundo paso de la glicólisis, la glucosa 6-fosfato isomerasa cataliza la conversión de glucosa 6-fosfato (una aldosa) en fructosa 6-fosfato (una cetosa), como muestra la figura 11.4). El anómero α del glucosa 6-fosfato (α-D-glucopiranosa 6-fosfato) se une de preferencia a la glucosa 6-fosfato isomerasa. La forma de cadena abierta de la glucosa 6-fosfato se genera entonces dentro del sitio activo de la enzima y sucede una conversión de aldosa a cetosa. La forma de la fructosa 6-fosfato en cadena abierta forma un ciclo, de α-D-fructofuranosa 6-fosfato. El mecanismo de la glucosa 6-fosfato isomerasa es parecido al de la triosa fosfato isomerasa (sección 6.4A).

La glucosa 6-fosfato isomerasa es muy estereoespecífica. Por ejemplo, en la reacción inversa que cataliza esta enzima, la fructosa 6-fosfato (donde el C-2 no es quiral) se convierte casi exclusivamente en glucosa 6-fosfato. Sólo se forman huellas de manosa 6-fosfato, el epímero de la glucosa 6-fosfato en C-2. La reacción de la glucosa 6-fosfato isomerasa está cercana al equilibrio. La reacción inversa es parte de la ruta para la biosíntesis de la glucosa.

3. Fosfofructocinasa-1

La fosfofructocinasa-1 (PFK-1, *phosphofructokinase-1*) cataliza la transferencia de un grupo fosforilo, de ATP al grupo hidroxilo de C-1 en la fructosa 6-fosfato, produciendo fructosa 1,6-*bi*fosfato.



(11.3)

Nótese que la reacción catalizada por la glucosa 6-fosfato isomerasa produce α-D-fructosa 6-fosfato. Sin embargo, el anómero β-D es el sustrato para el siguiente paso en la glicólisis: el catalizado por la fosfofructocinasa-1. Los anómeros α y β de la fructosa 6-fosfato se equilibran en forma espontánea (sección 8.2). Esta reacción es extremadamente rápida en solución acuosa, y no tiene efecto sobre la velocidad total de la glicólisis.

En la sección 12.3 se describirá la regulación coordinada de la glicólisis y la gluconeogénesis.

La reacción catalizada por la PFK-1 es metabólicamente irreversible, lo cual quiere decir que la enzima tal vez esté regulada. De hecho, este paso es un punto de control crítico para regular la glicólisis en la mayor parte de las células. La reacción catalizada por PFK-1 es el primer paso *comprometido* de la glicólisis, porque pueden entrar algunas hexosas distintas a la glucosa a la ruta glicolítica, por conversión directa a fructosa 6-fosfato, saltándose así los pasos catalizados por hexocinasa y glucosa 6-fosfato isomerasa (sección 11.6C). (La reacción metabólicamente irreversible catalizada por la hexocinasa *no es* el primer paso comprometido). Otra razón para regular la actividad de la PFK-1 tiene que ver con la competencia entre las rutas de la glicólisis y de la gluconeogénesis (figura 11.1). Se debe inhibir la actividad de la PFK-1 cuando se está sintetizando la glucosa.

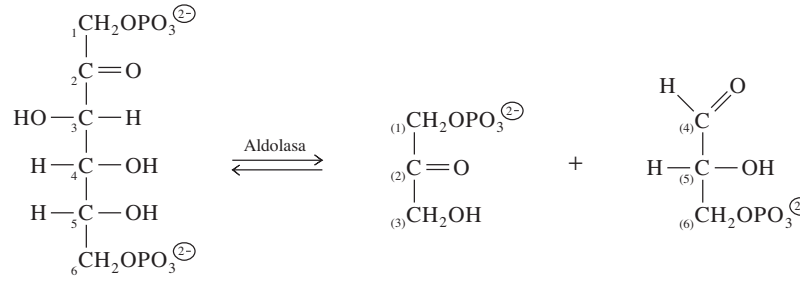
La estructura de *E. coli* fosfofructocinasa-1 se muestra en la figura 5.20.

La PFK-1 es una de las enzimas alostéricas clásicas. Recuérdese que la enzima bacteriana es activada por ADP, y se inhibe alostéricamente por el fosfoenolpiruvato (sección 5.10A). La actividad de la enzima en los mamíferos es regulada por AMP y citrato (sección 11.6C).

La PFK-1 tiene el sufijo -1 porque hay una segunda fosfofructocinasa que cataliza la síntesis de la fructosa 2,6-*bi*fosfato, en vez de la fructosa 1,6-*bi*fosfato. Esta segunda enzima, que se analizará más adelante en este capítulo, se conoce como PFK-2.

4. Aldolasa

En los tres primeros pasos de la glicólisis, la hexosa se prepara para su ruptura en dos fosfatos de triosa: el gliceraldehído 3-fosfato y la dihidroxiacetona fosfato.



Fructosa 1,6-*bi*fosfato — Dihidroxiacetona fosfato — Gliceraldehído 3-fosfato

(11.4)

La dihidroxiacetona fosfato se deriva de C-1 a C-3 de la fructosa 1,6-*bi*fosfato, y el gliceraldehído 3-fosfato se deriva de C-4 a C-6. La enzima que cataliza la reacción de escisión es la fructosa 1,6-*bi*fosfato aldolasa, que se suele llamar aldolasa. La ruptura de aldol es un mecanismo común para escindir enlaces C—C en sistemas biológicos. El mecanismo de la ruptura de enlace C—C (y de la formación de enlaces C—C en dirección inversa) catalizada por aldolasa se ve en la figura 11.5.

El cambio de energía libre de Gibbs estándar para esta reacción es muy positivo ($\Delta G^{\circ\prime} = +28$ kJ mol^{-1}). Sin embargo, la reacción de la aldolasa está cercana al equilibrio (ΔG real ≈ 0) en las células donde la glicólisis es una ruta catabólica importante. Esto se debe en gran parte al agotamiento rápido de las dos triosas producidas en los pasos siguientes de la ruta. Como se verá en el capítulo siguiente, la reacción inversa, fusión de dos compuestos con tres carbonos para formar la hexosa, es una parte importante en la ruta de biosíntesis de glucosa.

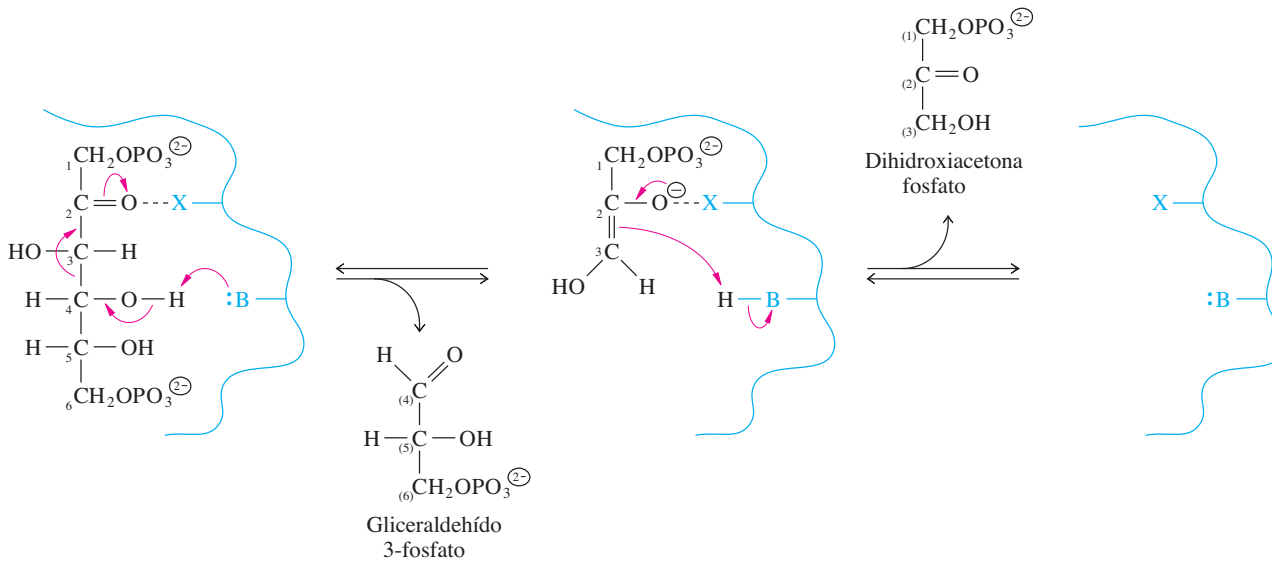


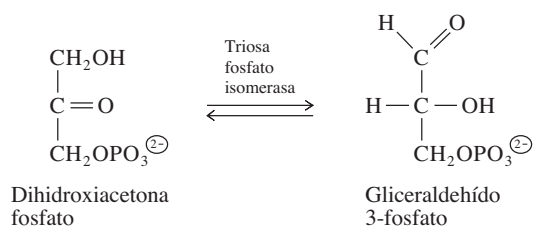
Figura 11.5 ▲
Mecanismo de la escisión aldólica catalizada por aldolasas. La fructosa 1,6-*bi*fosfato es el sustrato de aldol. Las aldolasas tienen un grupo (–X) ávido de electrones que polariza el grupo carbonilo de C-2 en el sustrato. Las aldolasas de clase I usan el grupo amino de un residuo de lisina en el sitio activo, y las aldolasas de clase II usan Zn^{2+} para este objetivo. Un residuo básico (representado por B:) elimina a un protón del grupo hidroxilo en el C-4 del sustrato.

Hay dos clases distintas de aldolasas. Las enzimas de la clase I se encuentran en plantas y animales, en tanto que las de la clase II son más comunes en las bacterias, hongos y protistas. Muchas especies tienen ambos tipos de la enzima. Las aldolasas de clase I y clase II no tienen relación entre sí. Las enzimas tienen estructuras y secuencias muy diferentes, a pesar de que catalizan la misma reacción con el mismo mecanismo.

La clave para comprender la estrategia de la glicólisis estriba en apreciar la importancia de la reacción de aldolasa. Lo mejor es imaginarla como una reacción de biosíntesis cercana al equilibrio. Las aldolasas evolucionaron originalmente como enzimas que podían catalizar la síntesis de la fructosa 1,6-*bi*fosfato. Esta reacción se efectuaba al final de una ruta de biosíntesis, que iba de piruvato a gliceraldehído 3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato. Durante la glicólisis, el flujo en la etapa de triosa tiene dirección contraria, hacia la síntesis de piruvato. Los primeros pasos de la glicólisis, la etapa de hexosa, se dirigen hacia la formación de fructosa 1,6-*bi*fosfato, para que pueda servir como sustrato para invertir la ruta que lleva a la síntesis. Considérese que la ruta de biosíntesis de la glucosa (gluconeogénesis) fue la que evolucionó primero. Sólo después de que la glucosa estuvo fácilmente disponible, evolucionaron las rutas de su degradación.

5. Triosa fosfato isomerasa

De las dos moléculas producidas al romperse la fructosa 1,6-*bi*fosfato, sólo el gliceraldehído 3-fosfato es un sustrato para la siguiente reacción en la ruta glicolítica. El otro producto, dihidroxiacetona fosfato, se convierte en glicaraldehído 3-fosfato en una reacción cercana al equilibrio y catalizada por triosa fosfato isomerasa.



(11.5)

A medida que se consume el gliceraldehído 3-fosfato en el paso 6, se mantiene su concentración de estado estable con el flujo desde el fosfato de dihidroxiacetona. De esta manera, se suministran dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato a la glicólisis, por cada molécula de fructosa 1,6-*bi*fosfato escindida. La triosa fosfato isomerasa cataliza una reacción estereoespecífica, por lo que sólo se forma el isómero D del gliceraldehído 3-fosfato.

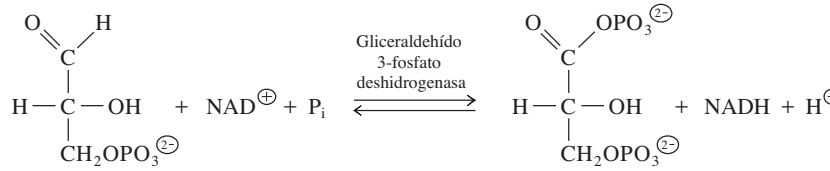
La triosa fosfato isomerasa, igual que la glucosa 6-fosfato isomerasa, cataliza una conversión de aldosa a cetosa. El mecanismo de la reacción de triosa fosfato isomerasa se describió en la sección 6.4A. Los mecanismos catalíticos de las aldosa-cetosa isomerasas se han estudiado con detalle, y al parecer una propiedad común en ellos es la formación de los intermedios de enodiolatos, unidos a enzima.

Las velocidades de reacción de algunas enzimas parecen controladas por difusión (sección 6.4). Estas enzimas catalizan reacciones con la rapidez con la que sus sustratos encuentran al sitio activo. La triosa fosfato isomerasa es una de esas enzimas; cataliza la interconversión de fosfato de dihidroxiacetona y gliceraldehído 3-fosfato, con una eficiencia cercana a la máxima.

El destino de los átomos individuales de carbono en una molécula de glucosa se muestra en la figura 11.6. Esta distribución se ha confirmado con estudios de marcadores radioisotópicos en diversos organismos. Los carbonos 1, 2 y 3 de una molécula de gliceraldehído 3-fosfato se derivan de los carbonos 4, 5 y 6 de la glucosa, en tanto que los carbonos 1, 2 y 3 de la segunda molécula de gliceraldehído 3-fosfato (convertida desde fosfato de dihidroxiacetona) provienen de los carbonos 3, 2 y 1 de la glucosa. Cuando se mezclan esas moléculas de gliceraldehído 3-fosfato para formar una sola reserva de metabolitos, ya no se puede distinguir un átomo de carbono procedente del C-1 de la glucosa, de un átomo de carbono procedente del C-6 de la glucosa.

6. Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

La recuperación de la energía de las triosas fosfato comienza con la reacción catalizada por la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. En este paso, se oxida y se fosforila el gliceraldehído 3-fosfato para formar 1,3-*bi*fosfoglicerato.



(11.6)

Esta es una reacción de oxidación-reducción: la oxidación del gliceraldehído 3-fosfato se acopla a la reducción del $NAD^{\oplus}$ a NADH. En algunas especies, la coenzima es $NADP^{\oplus}$. La reacción general es cercana al equilibrio en las células, aun cuando genera NADH y un compuesto (1,3-*bi*fosfoglicerato) que tiene mayor potencial de transferencia de grupo que el ATP. La oxidación del grupo aldehído del gliceraldehído 3-fosfato se efectúa con un cambio grande negativo de energía libre de Gibbs estándar, y algo de esa energía se conserva en el enlace de ácido-anhídrido del 1,3-*bi*fosfoglicerato. En el siguiente paso de la glicólisis, el grupo fosforilo en C-1 del 1,3-*bi*fosfoglicerato se transfiere al ADP para formar ATP. La energía restante se conserva en forma de equivalentes reductores (NADH). Como se vio en el capítulo anterior, cada molécula de NADH equivale a varias moléculas de ATP. Entonces, este paso es el principal productor de energía de toda la ruta. El cambio total de energía libre de Gibbs estándar (oxidación del aldehído y reducción del $NAD^{\oplus}$) es positivo, pero se da en dirección de la glicólisis debido al rápido consumo de 1,3-*bi*fosfoglicerato en el paso siguiente.

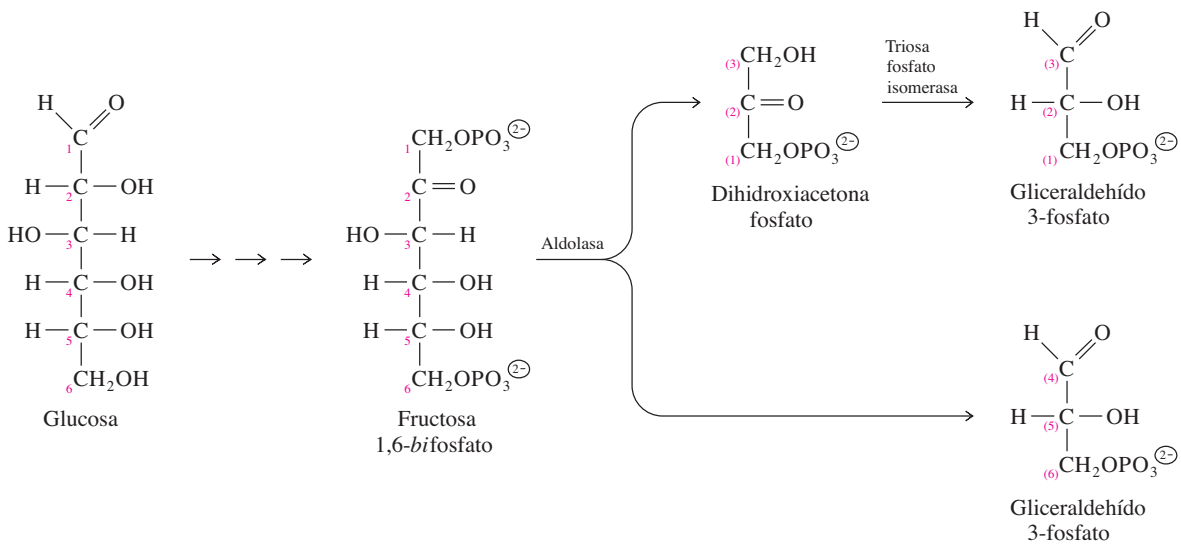
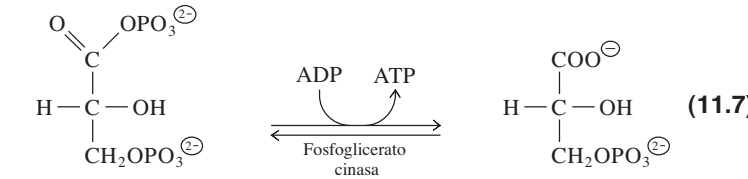


Figura 11.6 ▲
Destino de los átomos de carbono de la etapa de hexosa a la etapa de triosa en la glicólisis. Todos los números se refieren a los átomos de carbono en la molécula original de glucosa.

El NADH formado en la reacción de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa se vuelve a oxidar, ya sea por la cadena de transporte de electrones asociada a la membrana (capítulo 14) o en otras reacciones donde el NADH sirva como agente reductor, como en la reducción del acetaldehído a etanol, o de piruvato a lactato (sección 11.3B). La concentración de $NAD^{\oplus}$ en la mayoría de las células es baja. Entonces es esencial reabastecerlo reoxidando NADH, o de lo contrario la glicólisis se detendrá en este paso. En la sección 11.3 se verá que hay varias formas distintas de lograr esto.

7. Fosfoglicerato cinasa

La fosfoglicerato cinasa cataliza la transferencia de grupo fosforilo, del anhídrido mixto 1,3-*bi*fosfoglicerato, rico en energía, a ADP, generando ATP y 3-fosfoglicerato. La enzima se llama cinasa, por la reacción inversa, en la que se fosforila el 3-fosfoglicerato.

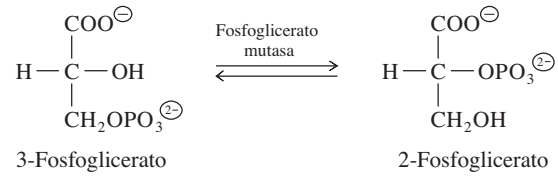


1,3-*Bi*fosfoglicerato — 3-Fosfoglicerato **(11.7)**

Los pasos 6 y 7 juntos acoplan la oxidación de un aldehído para formar un ácido carboxílico, con la fosforilación de ADP a ATP. La formación de ATP por la transferencia de un grupo fosforilo, desde un compuesto de alta energía (como el 1,3-*bi*fosfoglicerato) a ADP se llama **fosforilación a nivel de sustrato**. Esta reacción es el primer paso de la glicólisis que genera ATP. Funciona a concentraciones de sustrato y producto cercanas a las de equilibrio. No debe sorprender eso, ya que la reacción inversa es importante en la gluconeogénesis, donde se utiliza el ATP.

8. Fosfoglicerato mutasa

La fosfoglicerato mutasa cataliza la interconversión, cercana al equilibrio, de 3-fosfoglicerato y 2-fosfoglicerato, como se muestra en la siguiente página.



(11.8)

Las mutasas son isomerasas que catalizan la transferencia de un grupo fosforilo de una parte a otra en una molécula de sustrato. En un tipo de fosfoglicerato mutasa, el grupo fosforilo se transfiere primero a una cadena lateral de aminoácido en la enzima. El grupo fosforilo de la enzima se transfiere entonces al segundo sitio de la molécula de sustrato. El compuesto intermedio desfosforilado permanece unido en el sitio activo durante este proceso.

Otro tipo de fosfoglicerato mutasa usa un producto intermedio de 2,3-*bi*fosfoglicerato (2,3-BPG), como se ve en la figura 11.7. En este mecanismo también interviene un intermedio de enzima fosforilada, pero se diferencia del otro tipo de enzima porque nunca, durante la reacción, hay un metabolito desfosforilado. Se requieren cantidades pequeñas de 2,3-*bi*fosfoglicerato para que la actividad de este segundo tipo de enzima sea total. Esto se debe a que se requiere 2,3-BPG para fosforilar la enzima, si se desfosforila. La enzima perderá su grupo fosfato cuando se libere 2,3-BPG del sitio activo, antes de poder convertirlo en 2-fosfoglicerato o 3-fosfoglicerato. El segundo tipo de fosfoglicerato mutasa se llama PGM dependiente de cofactor, o dPGM. El primer tipo de enzima se llama PGM independiente de cofactor, o iPGM.

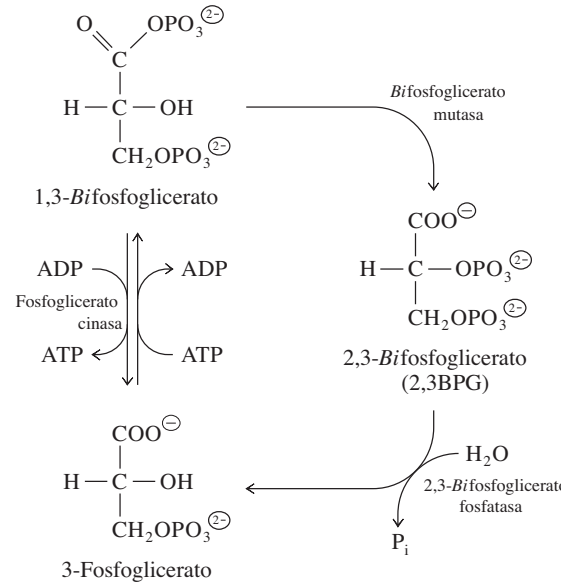
Los dPGM e iPGM no tienen relación evolutiva. La enzima dependiente de cofactor (dPGM) pertenece a una familia de enzimas que comprenden ácido fosfatasas y fructosa 2,5-*bi*fosfatasa. Es la forma principal de fosfoglicerato mutasa en los hongos, en algunas bacterias y en la mayoría de los animales. La enzima independiente de cofactor (iPGM) pertenece a la familia de enzimas de fosfatasa alcalina. Esta versión de fosfoglicerato mutasa se encuentra en plantas y en algunas bacterias. Algunas especies de bacterias tienen ambos tipos de enzima.

RECUADRO 11.2 Formación de 2,3-*bi*fosfoglicerato en los glóbulos rojos

Una función importante de la glicólisis en los glóbulos rojos es la producción de 2,3-*bi*fosfoglicerato, un inhibidor alostérico de la oxigenación de la hemoglobina (sección 4.13C). Este metabolito es un intermedio de reacción y un cofactor en el paso 8 de la glicólisis.

Los eritrocitos contienen *bi*fosfoglicerato mutasa. Esta enzima cataliza la transferencia de un grupo fosforilo de C-1 a C-2 del 1,3-*bi*fosfoglicerato, para formar 2,3-*bi*fosfoglicerato. Como se ve en el esquema de reacciones, la 2,3-*bi*fosfoglicerato fosfatasa cataliza la hidrólisis del exceso de 2,3 BPG a 3-fosfoglicerato, que puede volver a entrar a la glicólisis y convertirse en piruvato.

La ruta paralela de 1,3-*bi*fosfoglicerato mediante esas dos enzimas se salta a la fosfoglicerato cinasa, que cataliza el paso 7 de la glicólisis, uno de los dos pasos generadores de ATP. Sin embargo, sólo una parte del flujo glucolítico en los glóbulos rojos, cerca de 20%, se desvía por la mutasa y la fosfatasa. La acumulación de 2,3BPG libre (es decir, 2,3BPG no unido a hemoglobina) inhibe a la *bi*fosfoglicerato mutasa. A cambio de menor generación de ATP, esta desviación proporciona un suministro regulado de 2,3BPG, necesario para la liberación eficiente de O_2 por parte de la oxihemoglobina.



▲ Formación de 2,3-bifosfoglicerato (2,3BPG) en los glóbulos rojos.

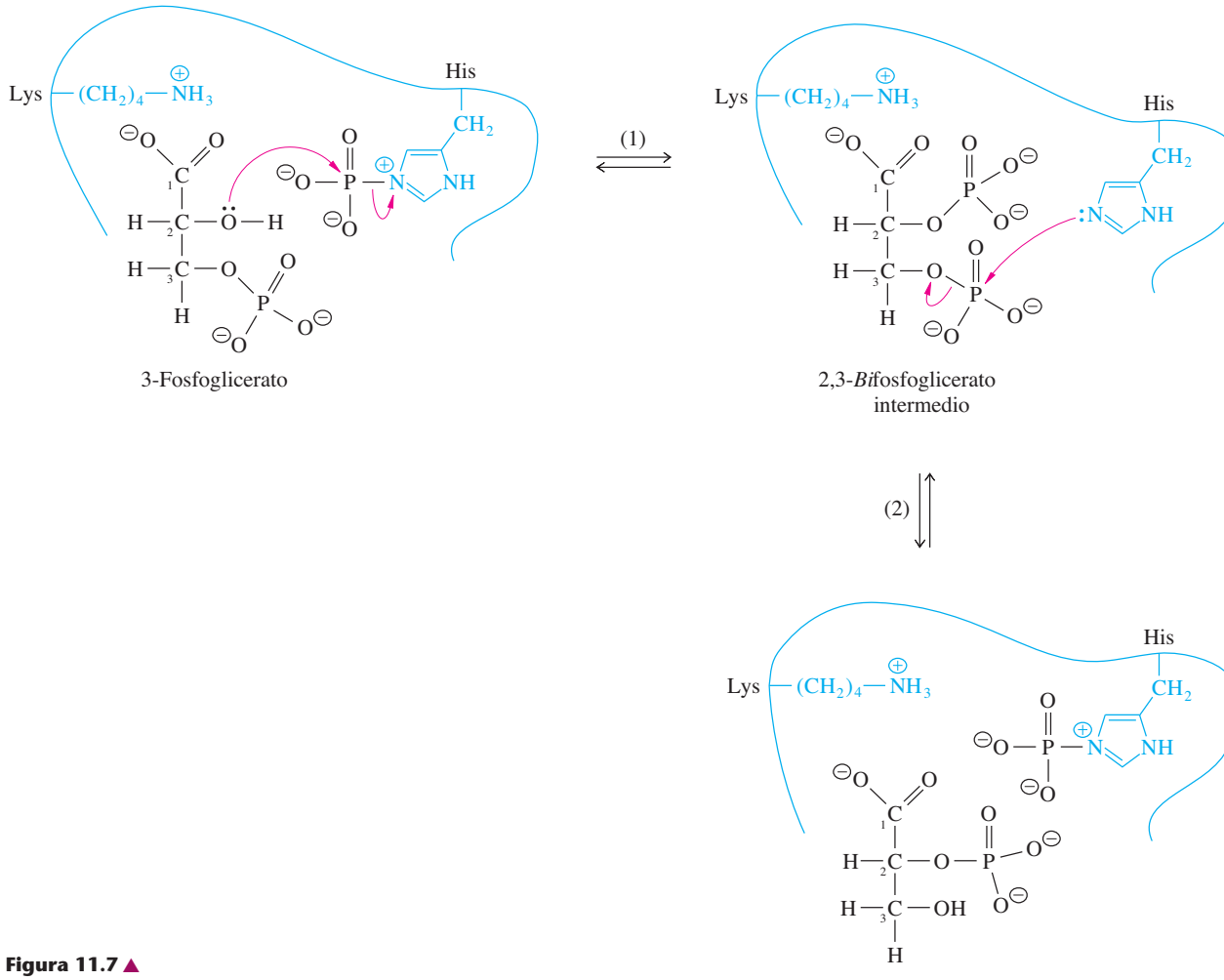
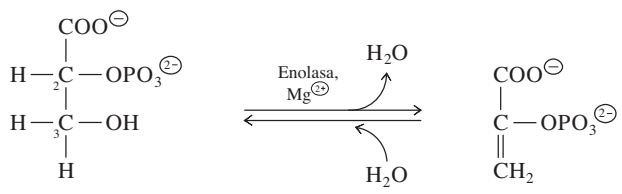


Figura 11.7 ▲
Mecanismo de dPGM para la conversión de 3-fosfoglicerato en 2-fosfoglicerato. (1) Un residuo de lisina en el sitio activo de la fosfoglicerato mutasa se une al anión carboxilato del 3-fosfoglicerato. Un residuo de histidina, que se fosforila antes de que se enlace al sustrato, dona su grupo fosforilo para formar el 2, 3-*bi*fosfoglicerato intermedio. (2) La refosforilación de la enzima con un grupo fosforilo de la posición C-3 en el compuesto intermedio forma 2-fosfoglicerato.

9. Enolasa

El 2-fosfoglicerato se deshidrata a fosfoenolpiruvato en una reacción casi en equilibrio, catalizada por enolasa. El nombre sistemático de la enolasa es 2-fosfoglicerato deshidratasa.



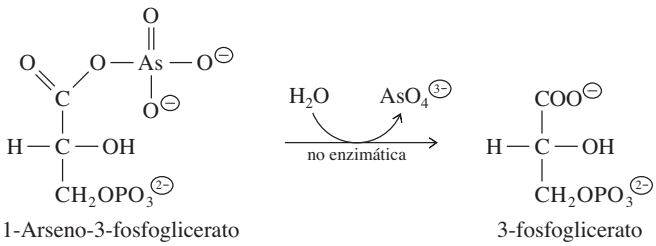
(11.9)

En esta reacción, el fosfomonoéster 2-fosfoglicerato se convierte en un éster de enol-fosfato, el fosfoenolpiruvato, por eliminación reversible de agua de C-2 y C-3.

RECUADRO 11.3 Envenenamiento con arseniato

El arsénico, como el fósforo, está en el grupo V de la tabla periódica. En consecuencia, el arseniato (AsO_4^{3-}) es un análogo del fosfato inorgánico. El arseniato compite con el fosfato para el sitio de enlazamiento en la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. Igual que el fosfato, el arseniato rompe el compuesto intermedio enzima-tioacilo, rico en energía. Sin embargo, el arseniato produce un análogo inestable del 1,3-*bi*fosfoglicerato, llamado 1-arseno-3-fosfoglicerato, que se hidroliza rápidamente al contacto con el agua. Esta hidrólisis no enzimática produce 3-fosfoglicerato y regenera el arseniato inorgánico, que puede reaccionar de nuevo con un intermedio de tioacilo-enzima. En presencia de arseniato, la glicólisis puede efectuarse a partir del 3-fosfoglicerato, pero se salta la reacción productora de ATP donde interviene el 1,3-*bi*fosfoglicerato. El resultado es que no hay formación neta de ATP en la glicólisis. El arseniato es un veneno porque puede sustituir al fosfato en muchas reacciones de transferencia de fosforilo.

El arsenito, AsO_2^-, es mucho más tóxico que el arseniato. El arsenito envenena por un mecanismo totalmente diferente al del arseniato. El átomo de arsénico del arsenito se une fuertemente a los dos átomos de azufre de la lipoamida (sección 7.12) y con ello inhibe a las enzimas que requieren a esa coenzima.



◀Hidrólisis espontánea de 1-arseno-3-fosfoglicerato. El arseniato inorgánico puede sustituir al fosfato inorgánico como sustrato para la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, formando el análogo inestable de 1-arseno, del 1,3-*bi*fosfoglicerato

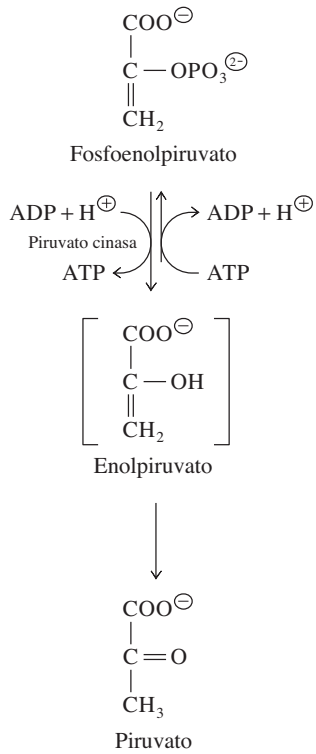


Figura 11.8 ▲
Formación de piruvato a partir de fosfoenolpiruvato, catalizada por piruvato cinasa. La transferencia del grupo fosforilo al ADP genera ATP en esta reacción metabólicamente irreversible. El inestable tautómero enol del piruvato es un intermedio enlazado a enzima.

El fosfoenolpiruvato tiene un potencial de transferencia de grupo fosforilo extremadamente alto, porque el grupo fosforilo mantiene al grupo carbonilo del piruvato en su forma enol, menos estable (sección 10.7B).

La enolasa requiere Mg^{2+} para su actividad. En esta reacción participan dos iones magnesio: un ion "conformacional" se une al grupo carboxilato del sustrato, y un ion "catalítico" participa en la reacción de deshidratación.

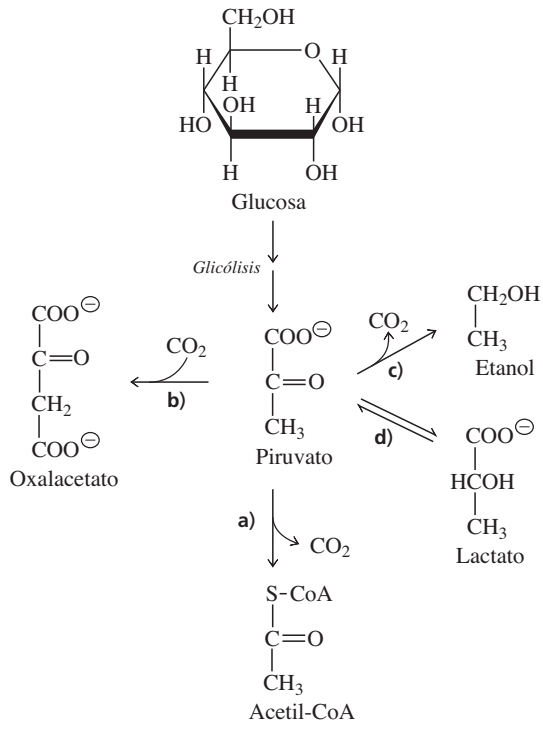
10. Piruvato cinasa

La segunda fosforilación a nivel sustrato en la glicólisis es catalizada por la piruvato cinasa (figura 11.8). La transferencia del grupo fosforilo del fosfoenolpiruvato al ADP es la tercera reacción metabólicamente irreversible de la glicólisis, y es otro sitio de regulación. La piruvato cinasa está regulada tanto por moduladores alostéricos como por modificación covalente. Además, la expresión del gen de piruvato cinasa en los mamíferos está regulada por diversas hormonas y nutrientes.

11.3 Destino del piruvato

La formación de piruvato a partir del fosfoenolpiruvato es el último paso de la glicólisis. El metabolismo posterior del piruvato suele tomar una de cuatro rutas (figura 11.9).

1. El piruvato puede convertirse en acetil-CoA por acción de piruvato deshidrogenasa (sección 13.1). La acetil-CoA se puede usar en varias rutas metabólicas; por ejemplo, se oxida totalmente a CO_2 en el ciclo del ácido cítrico (sección 13.2). Es una ruta que opera con eficiencia en presencia de oxígeno.
2. El piruvato se puede carboxilar y producir oxalacetato. El oxalacetato es uno de los compuestos intermedios en el ciclo del ácido cítrico, pero también es un compuesto intermedio en la síntesis de la glucosa. El destino del piruvato como precursor en la gluconeogénesis se describirá en el capítulo 12.



◀ Figura 11.9
Cuatro destinos principales del piruvato: **a)** Bajo condiciones aeróbicas, el piruvato se oxida y forma el grupo acetilo de la acetil-CoA, que puede entrar al ciclo del ácido cítrico para seguir oxidándose. **b)** El piruvato se puede convertir en oxalacetato, que puede ser un precursor en la gluconeogénesis. **c)** Bajo condiciones anaeróbicas, ciertos microorganismos fermentan la glucosa para formar etanol pasando por el piruvato. **d)** La glucosa sufre una glicólisis anaeróbica para formar lactato, en músculos que se ejercitan con vigor, en los glóbulos rojos y en otras células. También el piruvato entra a rutas anabólicas que no se muestran aquí.

3. En algunas especies, se puede reducir piruvato para formar etanol, que a continuación es excretado de las células. En el caso normal, esta reacción se efectúa bajo condiciones anaeróbicas donde es desfavorable la entrada de la acetil-CoA en el ciclo del ácido cítrico.
4. En algunas especies el piruvato se puede reducir a lactato. El lactato se puede transportar a células que lo regresan a piruvato para su entrada en alguna de las demás rutas. Esta también es una ruta anaeróbica.

El destino del piruvato como precursor en la biosíntesis de aminoácidos se describirá en la sección 17.3.

Durante la glicólisis, se reduce el $NAD^{\oplus}$ a NADH en la reacción de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (paso 6). Para que la glicólisis funcione en forma continua, la célula debe poder regenerar $NAD^{\oplus}$. En caso contrario, toda la coenzima se acumularía rápidamente en la forma reducida y se detendría la glicólisis. Bajo condiciones anaeróbicas, el NADH se puede oxidar mediante el sistema de transporte de electrones asociado a membrana (capítulo 14), que requiere oxígeno molecular. Bajo condiciones anaeróbicas, la síntesis del etanol o del lactato consume NADH, y regenera el $NAD^{\oplus}$ esencial para que continúe la glicólisis. En esta sección se describirá la síntesis del etanol y el lactato.

A. Metabolismo de piruvato a etanol

Muchas bacterias y algunos eucariotas son capaces de sobrevivir en ausencia de oxígeno. Convierten al piruvato en una diversidad de ácidos orgánicos que son excretados. El etanol es uno de los productos. Cobra importancia en la bioquímica porque la síntesis del etanol mediante cepas muy seleccionadas de levadura es importante en la producción de cerveza y vino. Las células de levadura convierten piruvato en etanol y CO_2, y oxidan NADH a $NAD^{\oplus}$. Se requieren dos reacciones. Primero se descarboxila el piruvato y forma acetaldehído en una reacción catalizada por la piruvato descarboxilasa. Esta enzima requiere de la coenzima taimina pirofosfato (TPP) y su mecanismo se describió en el capítulo sobre coenzimas (sección 7.7).

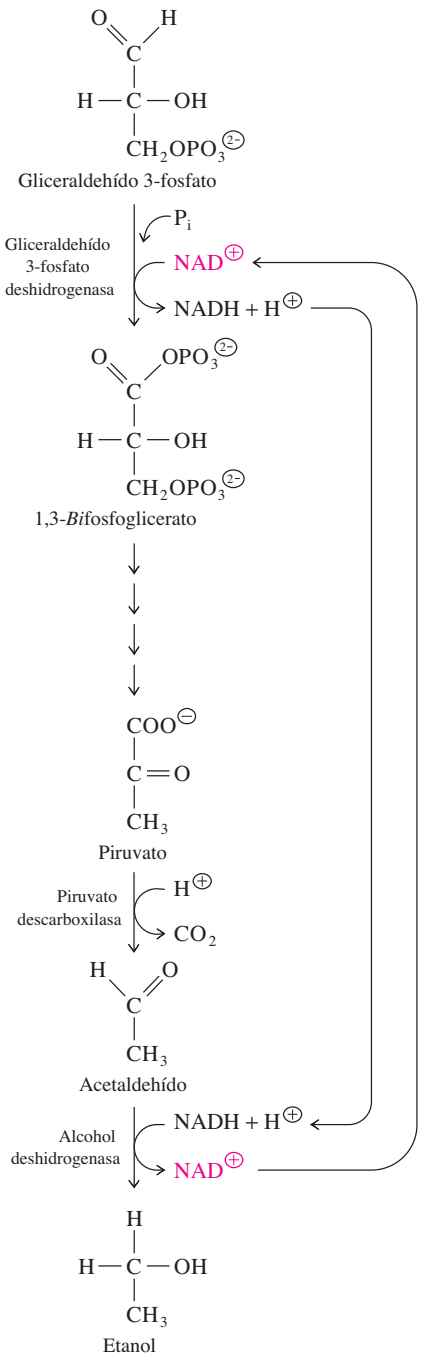


Figura 11.10 ▲
Conversión anaeróbica del piruvato a etanol, en la levadura.

La alcohol deshidrogenasa cataliza la reducción de acetaldehído a etanol. Esta reacción de oxidación-reducción se acopla a la oxidación de NADH. Estas reacciones y el ciclo de reducción y oxidación de NAD^+/NADH en la fermentación alcohólica se muestran en la figura 11.10.

La suma de las reacciones glicolíticas y la conversión de piruvato a etanol es

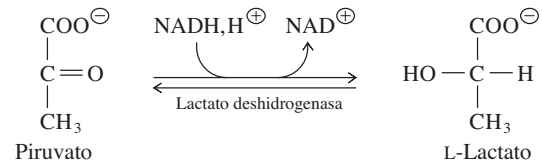
$$\text{Glucosa} + 2\ P_i^{2-} + ADP^{3-} + 2\ H^+ \longrightarrow$$

$$2\ \text{Etanol} + 2\ CO_2 + 2\ ATP^{4-} + 2\ H_2O \qquad \textbf{(11.10)}$$

Estas reacciones tienen aplicaciones comerciales familiares en la fabricación de cerveza y pan. En cervecería, el dióxido de carbono producido durante la conversión de piruvato a etanol se puede captar y usar para carbonatar la bebida alcohólica producida (este gas produce la capa espumosa). En panadería, el dióxido de carbono hace que se esponje la masa.

B. Reducción de piruvato a lactato

El piruvato se reduce a lactato en una reacción reversible, catalizada por lactato deshidrogenasa. Esta reacción es común en bacterias anaeróbicas, y también en mamíferos.



(11.11)

La lactato deshidrogenasa es una deshidrogenasa clásica que usa NAD^+ como coenzima. El mecanismo se presentó en la sección 7.4. Es una reacción de óxido-reducción, donde el piruvato se reduce a lactato por transferencia de un par de electrones y un protón desde el NADH.

En la reacción de lactato deshidrogenasa se oxidan los equivalentes reductores generados en la reacción del gliceraldehído 3-fosfato, y disminuye la ganancia de energía potencial en la glicólisis. Tiene el mismo papel que la producción de etanol en otras especies (figura 11.10). El efecto neto es mantener el flujo en la ruta glicolítica, y producir ATP. En las bacterias, el lactato se secreta o se convierte en otros productos finales, como propionato. En los mamíferos, el lactato sólo se puede volver a convertir en piruvato. Por consiguiente, el lactato es un producto terminal metabólico en las células de mamíferos.

La producción de lactato en las células de mamíferos es esencial en tejidos donde la glucosa es la principal fuente de carbono, y no se necesitan equivalentes reductores (NADH) en reacciones de biosíntesis, o no se pueden usar para generar ATP en la fosforilación oxidativa. Un buen ejemplo es la formación de lactato en células musculoesqueléticas durante el ejercicio vigoroso. El lactato formado en las células musculares es transportado fuera de las células y llevado por el torrente sanguíneo al hígado, donde se convierte en piruvato por la acción de la lactato deshidrogenasa hepática. El metabolismo posterior del piruvato requiere oxígeno. Cuando es inadecuado el suministro de oxígeno a los tejidos, todos ellos producen lactato por glicólisis anaeróbica. Bajo esas condiciones, el lactato se acumula causando un aumento de ácido láctico en la sangre, estado llamado acidosis. Durante la acidosis láctica, el pH de la sangre puede bajar hasta niveles peligrosamente ácidos.

La reacción total para la degradación de la glucosa a lactato es

$$\text{Glucosa} + 2\ P_i^{2-} + 2\ ADP^{3-} \longrightarrow 2\ \text{Lactato}^- + 2\ ATP^{4-} + 2\ H_2O \qquad \textbf{(11.12)}$$

El ácido láctico es la sustancia que causa dolor en los músculos durante y después del ejercicio. También es producido por *Lactobacillus* y otras bacterias, cuando fermentan los azúcares en la leche. El ácido desnaturaliza las proteínas en la leche, y causa el cuajo necesario para la producción de queso y yogurt.

Independientemente de cuál sea el producto final, etanol o lactato, la glicólisis genera dos moléculas de ATP por molécula de glucosa consumida. En ambos casos no se requiere oxígeno. Esta propiedad es esencial no sólo para los organismos anaerobios, sino también para algunas células especializadas en organismos multicelulares. Algunos tejidos (como médula de riñones y partes del cerebro), llamados tejidos glicolíticos obligatorios, se basan en la glicólisis para obtener toda su energía. Por ejemplo, en la córnea del ojo, la disponibilidad del oxígeno se limita por la mala circulación sanguínea. La glicólisis anaeróbica suministra el ATP necesario para esos tejidos.

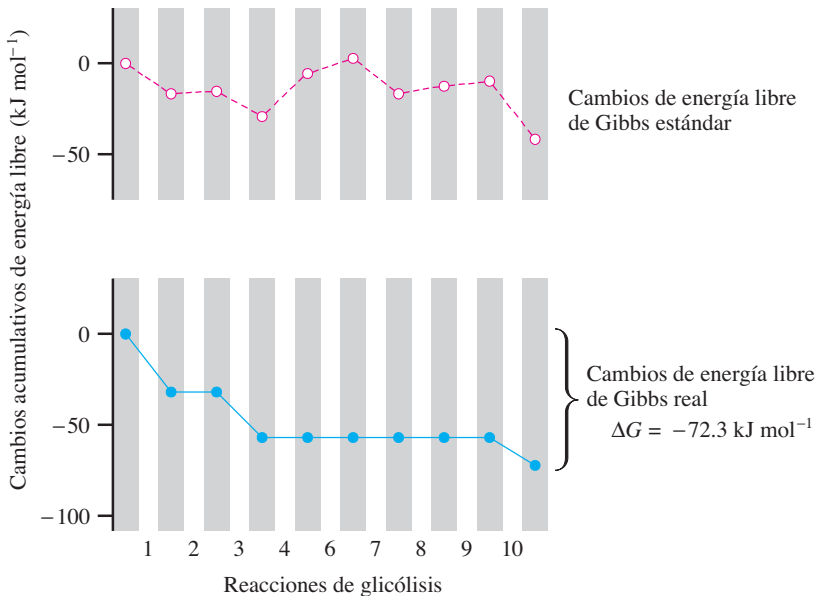
11.4 Cambios de energía libre en la glicólisis

Cuando está operando la ruta glicolítica, el flujo de metabolitos va de glucosa a piruvato. Bajo esas condiciones, el cambio de energía libre de Gibbs para cada reacción debe ser negativo o cero. Es interesante comparar los cambios de energía libre de Gibbs *estándar* ($\Delta G°'$) con los cambios de energía libre de Gibbs *real* (ΔG), bajo condiciones en las que es alto el flujo por la ruta glicolítica. Esas condiciones ocurren en los eritrocitos, donde la glucosa sanguínea es la fuente principal de energía, y hay muy poca síntesis de carbohidratos (o de cualquier otra molécula). Se han medido las concentraciones reales de los productos intermedios en la glicólisis y se han calculado los cambios de energía libre de Gibbs.

La figura 11.11 muestra los cambios acumulados de energía libre de Gibbs estándar, y los cambios de energía libre reales, para las reacciones glicolíticas en los eritrocitos. El eje vertical es de cambios de energía libre de Gibbs acumulada para cada uno de los pasos de la glicólisis. La figura ilustra la diferencia entre cambios de energía libre bajo condiciones estándar ($\Delta G°'$) y cambios de energía libre bajo condiciones celulares (ΔG).

La gráfica inferior representa los cambios acumulados de energía libre real. Muestra que cada reacción tiene un cambio de energía libre de Gibbs que es negativo o cero. Este es un requisito esencial en la conversión de glucosa a piruvato. Se deduce que la ruta total, que es la suma de las reacciones individuales, también debe tener un cambio negativo de energía libre. El cambio total de energía libre de Gibbs para la glicólisis es unas –72 kJ mol^{-1} bajo las condiciones que se encuentran en los eritrocitos.

Los cambios reales de energía libre de Gibbs sólo son grandes para los pasos 1, 3 y 10, que son catalizados por hexocinasa, fosfofructocinasa-1 y piruvato cinasa, respectivamente; son los pasos metabólicamente irreversibles y además están regulados. Los



◀ Figura 11.11
Cambios acumulativos de energía libre de Gibbs estándar y reales para las reacciones de glicólisis. El eje vertical es de cambios de energía libre en kJ mol^{-1}. Las reacciones de glicólisis se grafican en secuencia horizontalmente. La gráfica superior sigue los cambios de energía libre estándar y la gráfica inferior muestra los cambios de energía libre real en los eritrocitos. No se muestra la reacción de interconversión catalizada por la triosa fosfato isomerasa (paso 5). [Adaptada de Hamori, E. (1975). Illustration of free energy changes in chemical reactions. *J. Chem. Ed.* 52:370-373].

valores de ΔG para los demás pasos se acercan mucho a cero. En otras palabras, esos pasos son reacciones cercanas al equilibrio en las células.

En contraste, los cambios de energía libre de Gibbs para las mismas diez reacciones no muestran una pauta consistente. Aunque las tres reacciones con cambios de energía libre de Gibbs grandes y negativos en las células también tienen cambios grandes de energía libre de Gibbs estándar, eso puede ser casual, ya que algunas de las reacciones cercanas al equilibrio en las células también tienen valores grandes de $\Delta G°'$. Además, algunos de los valores de $\Delta G°'$ para las reacciones de la glicólisis son positivos, e indican que bajo condiciones estándar, el flujo por esas reacciones es hacia el sustrato, y no hacia el producto. Esto es especialmente obvio en el paso 4 (aldolasa) y en el paso 6 (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa). En otras clases de células, estas reacciones cercanas al equilibrio podrían operar en dirección contraria durante la síntesis de glucosa.

11.5 Regulación de la glicólisis

Se ha examinado con detalle la regulación de la glicólisis, así como de cualquier otra ruta. Los datos sobre la regulación provienen en especial de dos tipos de investigación bioquímica: enzimología y bioquímica del metabolismo. En los métodos enzimológicos, se ensayan los efectos de metabolitos sobre enzimas aisladas, y se estudian la estructura y los mecanismos de regulación de enzimas individuales. En bioquímica del metabolismo se analizan las concentraciones de productos intermedios en la ruta, *in vivo*, y se subraya la dinámica de la ruta bajo condiciones celulares. A veces se encuentra que los estudios *in vitro* son decepcionantes como indicadores de dinámica de ruta *in vivo*. Por ejemplo, un compuesto puede modular *in vitro* la actividad de una enzima, pero sólo a concentraciones que no se encuentran en la célula. La interpretación exacta de los datos bioquímicos se beneficia mucho de una combinación de conocimientos enzimológicos y metabólicos.

En esta sección se examina cada sitio regulador de la glicólisis. El enfoque principal es hacia la regulación de la glicólisis en células de mamíferos; en particular, las células donde la glicólisis es una ruta importante. Las variaciones en los temas de regulación que se presentan aquí se pueden encontrar en otras especies.

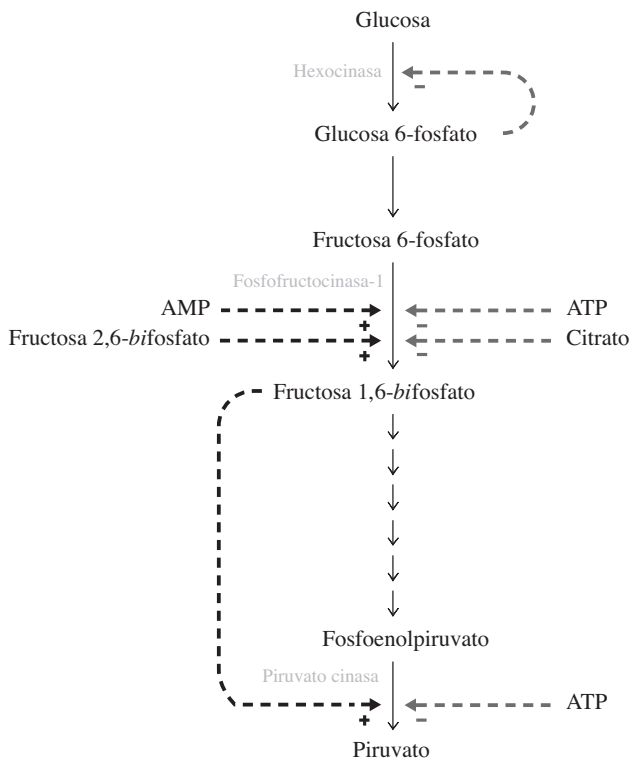
Los efectos reguladores de los metabolitos sobre la glicólisis se resumen en la figura 11.12. La activación de la glicólisis es deseable cuando se requiere ATP en procesos como contracción muscular. La hexocinasa se inhibe por un exceso de glucosa 6-fosfato, y la PFK-1 lo hace por la acumulación del ATP y del citrato (intermedio en el ciclo del ácido cítrico, productor de energía). El ATP y el citrato indican ambos un suministro adecuado de energía. El consumo de ATP conduce a la acumulación de AMP, que disminuye la inhibición de la PFK-1 por el ATP. También, la fructosa 2,6-*bi*fosfato reduce esta inhibición. La velocidad de formación de fructosa 1,6-*bi*fosfato aumenta entonces, lo cual activa, en ciertos tejidos, a la piruvato cinasa. La actividad glicolítica disminuye cuando ya no se requieren sus productos.

A. Regulación de los transportadores de hexosas

El primer paso posible para controlar la glicólisis es el transporte de glucosa hacia adentro de la célula. En la mayor parte de las células de mamíferos, la concentración intracelular de glucosa es mucho menor que la concentración de glucosa en la sangre, y la glucosa entre en las células, en dirección de su gradiente de concentración, por transporte pasivo. Todas las células de mamíferos poseen transportadores de glucosa por toda la membrana. Las células intestinales y renales tienen un sistema de cotransporte dependiente de $Na^{\oplus}$, llamado SGLT1, para absorber la glucosa de la dieta y la glucosa de la orina, respectivamente. Otras células de mamíferos contienen transportadores de la familia GLUT de transportadores pasivos de hexosa. Cada uno de los seis miembros de la familia GLUT tiene propiedades únicas adecuadas para las actividades metabólicas de los tejidos donde se forman.

La hormona insulina estimula altas velocidades de absorción de glucosa en las células esqueléticas y del músculo cardiaco y adipocitos, mediante el transportador GLUT4. Cuando la insulina se enlaza a receptores en la superficie de la célula, se funden vesículas intracelulares, que tienen GLUT4 embebido en sus membranas, con la super-

En la sección 9.11 se describieron los sistemas de transporte de membrana.



◀ Figura 11.12
Resumen de la regulación metabólica de la ruta glicolítica en los mamíferos. No se muestran los efectos del ADP sobre PFK-1, que varía entre las especies.

ficie de la célula, por exocitosis (sección 9.11E), y así aumenta la capacidad de las células para transportar glucosa (figura 11.13). Como el GLUT4 se encuentra en altas concentraciones sólo en los músculos estriados y en el tejido adiposo, la absorción de glucosa regulada por insulina sólo se efectúa en esos tejidos.

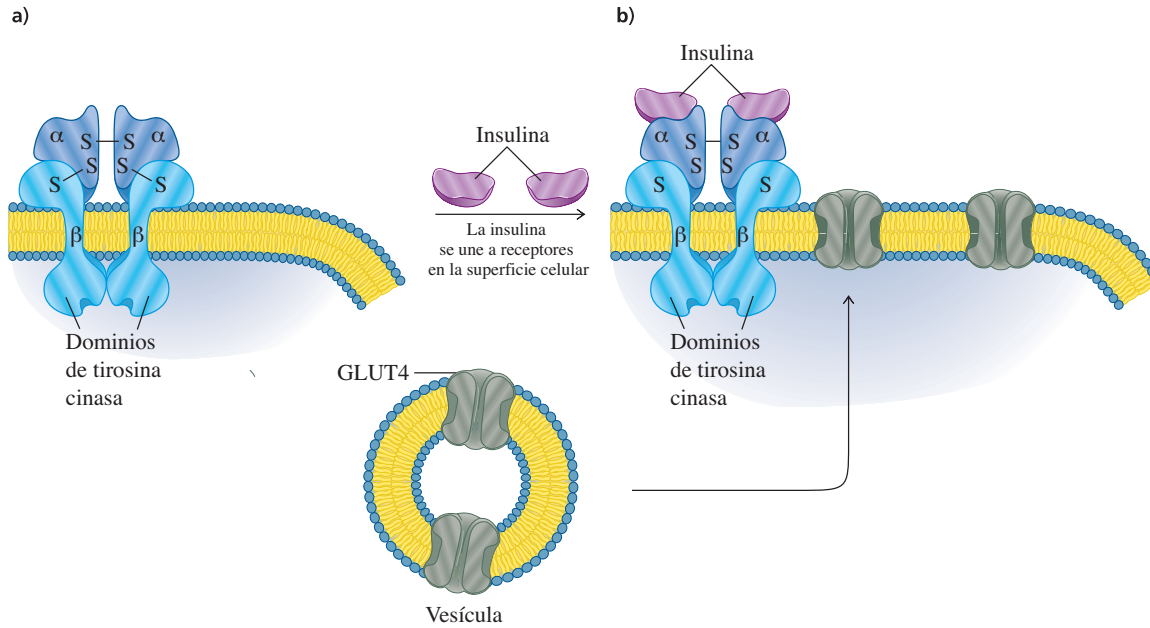


Figura 11.13 ▲
Regulación del transporte de glucosa por la insulina. La unión de insulina a los receptores en la superficie celular estimula a las vesículas intracelulares que contienen transportadores de GLUT4 embebidos en la membrana, para que se fundan a la membrana plasmática. Esto manda a los transportadores de GLUT4 a la superficie celular, y con ello aumenta la capacidad de la célula para transportar glucosa.

En la mayor parte de los tejidos, GLUT1 y GLUT3 mantienen un nivel basal de transporte de glucosa en ausencia de insulina. El GLUT2 transporta glucosa que entra y sale del hígado, y GLUT5 transporta fructosa en el intestino delgado. GLUT7 transporta glucosa 6-fosfato del citoplasma al interior del retículo endoplásmico.

Una vez dentro de una célula, la glucosa se fosforila rápidamente por acción de la hexocinasa. Esta reacción atrapa a la glucosa dentro de la célula, ya que la glucosa fosforilada no puede cruzar la membrana plasmática. Como se verá, también puede usarse la glucosa fosforilada en la síntesis de glucógeno o en la ruta de las pentosas fosfato (capítulo 12).

B. Regulación de hexocinasa

La reacción que cataliza la hexocinasa es metabólicamente irreversible, y como muchas reacciones irreversibles, es un punto potencial de control. En las bacterias y en muchos eucariotas, la enzima no se regula alostérmicamente, pero en los mamíferos, las diversas formas de hexocinasa están sujetas a una regulación compleja. El producto de la enzima, glucosa 6-fosfato, inhibe en forma alostérica las isozimas I, II y III de la hexocinasa, pero no a la glucocinasa (isozima IV). La glucocinasa es más abundante que las demás hexocinasas en el hígado, y en las células secretoras de insulina en el páncreas. La concentración de glucosa 6-fosfato aumenta cuando se inhibe la glicólisis en sitios más adelante en la ruta. En consecuencia, la inhibición de las hexocinasas I, II y III por la glucosa 6-fosfato coordina la actividad de la hexocinasa con la actividad de enzimas posteriores en la glicólisis.

La glucocinasa se presta al papel fisiológico del hígado, para manejar el suministro de glucosa para todo el organismo. En la mayor parte de las células, las concentraciones de glucosa se mantienen muy por abajo de la concentración en la sangre. Sin embargo, la glucosa entra libremente al hígado a través de GLUT2, y la concentración de glucosa en las

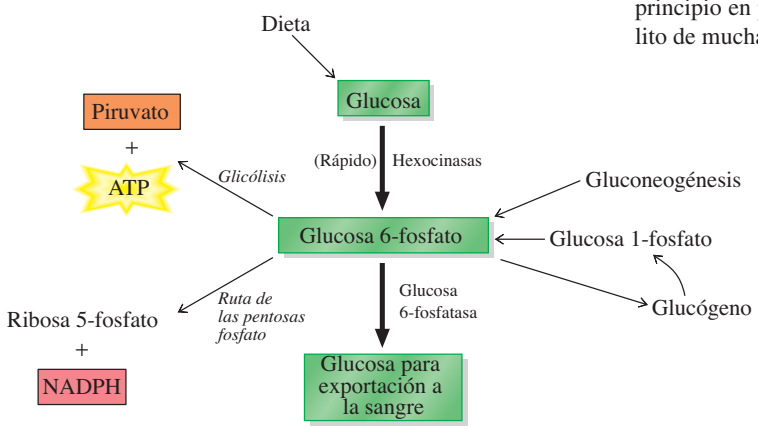
RECUADRO 11.4 Función metabólica esencial de la glucosa 6-fosfato en el hígado

La glucosa 6-fosfato es un sustrato inicial para varias rutas metabólicas (figura siguiente). Ya se vio que es el intermedio inicial en la glicólisis. La glucosa 6-fosfato se forma rápidamente en el hígado, a partir de la glucosa en la dieta, o de glucosa recién sintetizada (a partir de la gluconeogénesis en el hígado, sección 12.1).

El uso principal de la glucosa 6-fosfato hepática es mantener una concentración constante de glucosa en la sangre. La glucosa 6-fosfatasa es la enzima que cataliza la hidrólisis de la glucosa 6-fosfato a glucosa. (Esta reacción también es el último paso de la gluconeogénesis).

La glucosa 6-fosfato que no se requiere como glucosa sanguínea se almacena en forma de glucógeno hepático (sección 12.6). Después, el glucógeno se degrada cuando se necesita un suministro de glucosa. Las hormonas regulan tanto la síntesis como la degradación del glucógeno.

Además de usarlo para balancear la concentración de glucosa en la sangre, el hígado metaboliza glucosa 6-fosfato con la ruta de las pentosas fosfato (sección 12.5) para producir ribosa 5-fosfato (para nucleótidos) y NADPH (para síntesis de ácidos grasos). Ya se vio en este capítulo que la glucosa 6-fosfato también puede entrar a la ruta glicolítica, donde se convierte al principio en piruvato, que lleva a la formación de otro metabolito de mucha importancia: la acetil-CoA.



◀ La glucosa 6-fosfato está en una posición de pivote, en el metabolismo de carbohidratos en el hígado.

células hepáticas iguala a la que hay en la sangre. La concentración de glucosa en la sangre es típicamente de 5 mM, aunque después de un alimento puede subir hasta 10 mM. La mayor parte de las hexocinasas tienen valores de K_m para glucosa de casi 0.1 mM o menos. En contraste, la glucocinasa tiene una K_m de 2 a 5 mM para glucosa; además, no está inhibida por glucosa 6-fosfato. Por consiguiente, las células hepáticas pueden formar glucosa 6-fosfato (para síntesis de glucógeno) por acción de glucocinasa, cuando la glucosa es abundante y otros tejidos tienen glucosa suficiente.

La actividad de la glucocinasa es modulada por los fosfatos de fructosa. En las células hepáticas, una proteína reguladora inhibe a la glucocinasa en presencia de fructosa 6-fosfato, y reduce su afinidad hacia la glucosa hasta unos 10 mM (figura 11.14). Las curvas de v_0 contra [S] para la glucocinasa son sigmoidales, y no las curvas hiperbólicas esperadas para una enzima que se apegue a la cinética de Michaelis-Menten. Es una característica común de las proteínas alostéricamente reguladas. Indica que no hay valor real de K_m para la glucocinasa. Puede decirse que el efecto de la proteína reguladora es elevar la K_m *aparente* de la enzima. El flujo por la glucocinasa suele ser bajo, porque las células hepáticas contienen siempre bastante fructosa 6-fosfato. El flujo puede aumentar después de una comida, cuando la fructosa 1-fosfato, derivada sólo de la fructosa en la dieta, disminuye la inhibición de glucocinasa por la proteína reguladora. En consecuencia, el hígado puede responder a aumentos de concentración de carbohidratos en la sangre, con aumentos proporcionales en la velocidad de fosforilación de la glucosa.

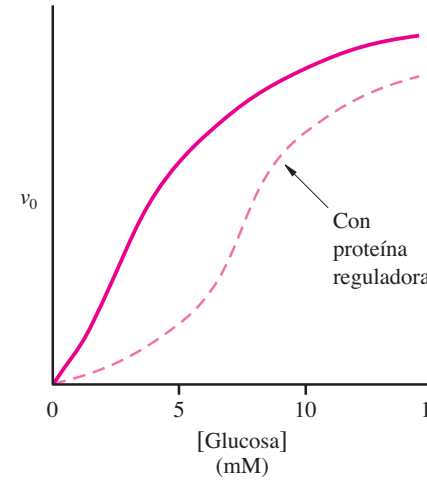


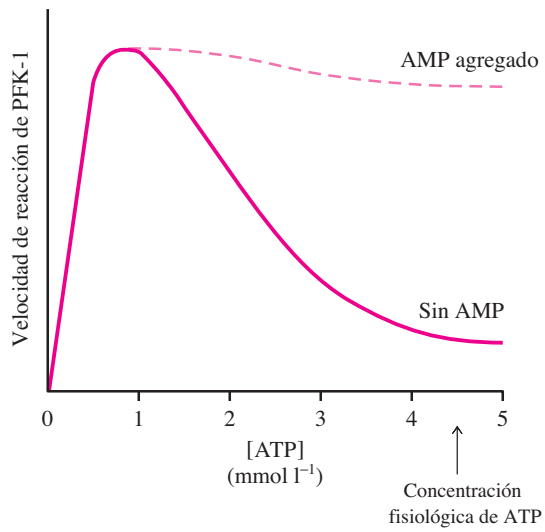
Figura 11.14 ▲
Gráfica de la velocidad inicial (v_0) en función de la concentración de glucosa para la glucocinasa. La adición de una proteína reguladora baja la afinidad de la enzima hacia la glucosa. La concentración de la glucosa en la sangre es de 5 a 10 mM.

C. Regulación de la fosfofructocinasa-1

El segundo sitio de regulación alostérica de la glicólisis es la reacción catalizada por fosfofructocinasa-1 (PFK-1). La PFK-1 es una enzima oligómera grande, con peso molecular, en las distintas especies, que va desde unos 130 000 hasta 600 000. La estructura cuaternaria de la PFK-1 también varía entre las especies. Las enzimas bacterianas y de mamíferos son tetrámeras, en tanto que la enzima de levadura es un octámero. Esta enzima compleja tiene varios sitios reguladores. Las propiedades reguladoras de la fosfofructocinasa-1 de *Escherichia coli* se describieron en la sección 5.10A.

El ATP es a la vez un sustrato, y en la mayor parte de las especies, un inhibidor alostérico de la PFK-1. El ATP aumenta la K_m aparente de la PFK-1 para el fructosa 6-fosfato. En las células de mamíferos, el AMP es un activador alostérico de PFK-1 que actúa disminuyendo la inhibición causada por ATP (figura 11.15). El ADP activa la PFK-1 en los mamíferos, pero inhibe la cinasa en las plantas; en las bacterias, protistas y hongos, los efectos reguladores de los nucleótidos de purina varían entre las especies.

La concentración de ATP varía poco en la mayor parte de las células de mamíferos, no obstante los grandes cambios en la velocidad de su formación y utilización. Sin embargo,



◀ **Figura 11.15**
Regulación de PFK-1 por ATP y AMP. En ausencia de AMP, la PFK-1 se inhibe casi por completo con concentraciones fisiológicas de ATP. Entre los límites de concentraciones de AMP que hay en la célula, se anula casi por completo la inhibición de PFK-1 por ATP. [Adaptada de Martin, B. R. (1987). *Metabolic Regulation: A Molecular Approach* (Oxford: Blackwell Scientific Publications), p. 222].

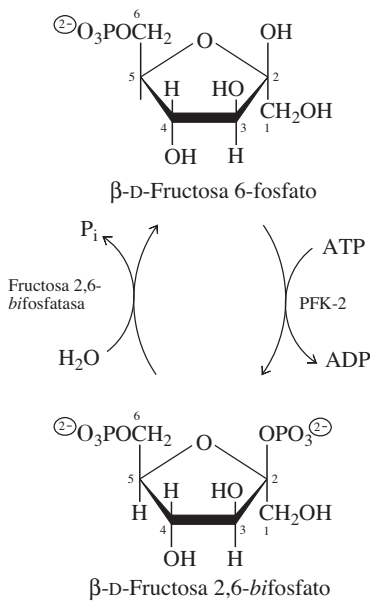


Figura 11.16 ▲
Interconversión de β-D-fructosa 6-fosfato y β-D-fructosa 2,6-*bi*fosfato.

La ruta de señalización con adenilil ciclasa se describió en la sección 9.12B.

como se describió en la sección 10.6, se presentan cambios importantes en las concentraciones de ADP y AMP, porque esas moléculas existen en las células en concentraciones mucho menores que la de ATP, y pequeños cambios en la concentración de ATP causan cambios proporcionalmente mayores en las concentraciones de ADP y AMP. En consecuencia, las concentraciones de estado estable de estos compuestos pueden controlar el flujo a través de la PFK-1.

El citrato, un intermedio en el ciclo del ácido cítrico, es un inhibidor de importancia fisiológica para la PFK-1. Una concentración elevada de citrato indica que el ciclo del ácido cítrico está bloqueado, y que no tendría objeto producir más piruvato. El efecto regulador del citrato sobre la PFK-1 es un ejemplo de inhibición por retroalimentación, que regula el abasto de piruvato al ciclo del ácido cítrico.

La actividad de la PFK-1 está regulada por el pH intracelular. Por ejemplo, durante el ejercicio pesado, la glicólisis anaeróbica produce ácido láctico en las células musculares. Si el ácido láctico no es eliminado con la rapidez suficiente por la sangre, baja el pH y se inhibe la PFK-1 por el exceso de iones hidrógeno.

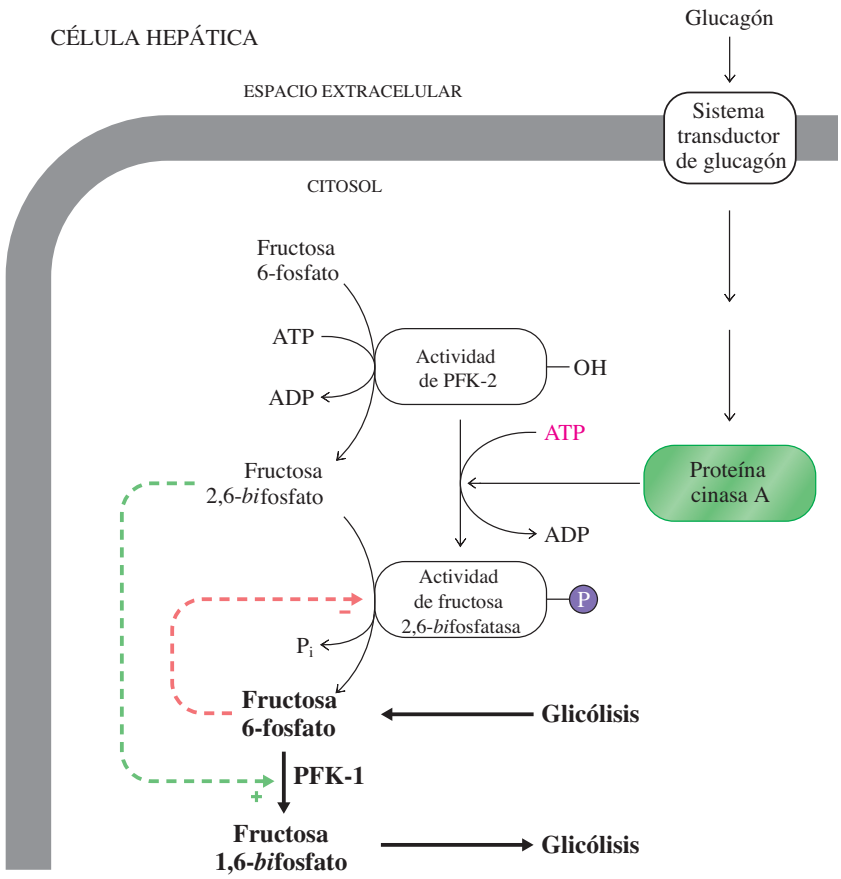
La fructosa 2,6-*bis*fosfato (figura 11.16) es un activador potente de PFK-1, eficaz en los dominios micromolares. Este compuesto existe en los mamíferos, hongos y plantas, pero no en los procariotas.

La fructosa 2,6-*bis*fosfato se forma a partir de fructosa 6-fosfato, por acción de la enzima fosfofructocinasa-2 (PFK-2, o fructosa 6-fosfato, cinasa 2). La PFK-2 es estimulada por fosfato inorgánico e inhibida por citrato. En forma sorprendente, en el hígado de los mamíferos, un sitio activo diferente en la misma proteína es el que cataliza la desfosforilación hidrolítica de fructosa 2,6-*bi*fosfato para volver a formar fructosa 6-fosfato. Esta actividad de la enzima se llama fructosa 2,6-*bi*fosfatasa. Las actividades paralelas de la PFK-2 controlan la concentración de fructosa 2,6-*bi*fosfato en estado estable.

En el hígado, la actividad de la PFK-2 se vincula con la acción del glucagón, hormona producida en el páncreas como respuesta a concentraciones bajas de glucosa en la sangre. Una elevación en la concentración de glucagón en la sangre dispara la ruta de señalización de adenilil ciclasa en las células hepáticas, lo que culmina en la fosforilación de un residuo de serina en la PFK-2 (figura 11.17). La fosforilación desactiva la actividad de la cinasa, de la enzima bifuncional, y activa su actividad de fosfatasa. Bajo estas condiciones baja la concentración de fructosa 2,6-*bi*fosfato, la PFK-1 se vuelve menos activa y disminuye la glicólisis. Bajo las condiciones en las que la glucosa se metaboliza rápidamente, la concentración de glucagón baja, la concentración de fructosa 6-fosfato aumenta y se forma más fructosa 2,6-*bi*fosfato, ya que la fructosa 6-fosfato es un sustrato de PFK-2 y a la vez es un inhibidor potente de la fructosa 2,6-*bi*fosfatasa. Una fosfoproteína fosfatasa cataliza la desfosforilación de PFK-2. Así, en las células hepáticas se logra controlar la glicólisis mediante el glucagón, y la glucosa mediante el control de la enzima bifuncional cuya actividad establece la concentración de fructosa 2,6-*bi*fosfato en estado estable.

D. Regulación de piruvato cinasa

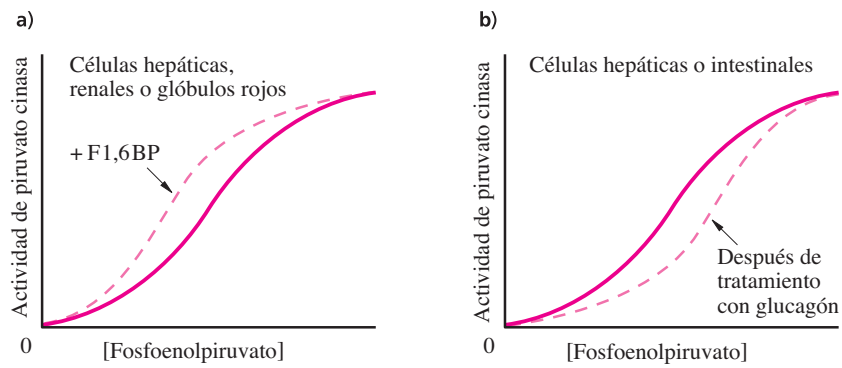
El tercer sitio de regulación alostérica de la glicólisis es la reacción catalizada por la piruvato cinasa. Hay presentes cuatro isozimas diferentes de piruvato cinasa en los tejidos de mamíferos. Las isozimas que se encuentran en hígado, riñón y glóbulos rojos producen una curva sigmoidal cuando se grafica la velocidad inicial en función de la concentración de fosfoenolpiruvato (figura 11.18a). Estas enzimas están activadas alostéricamente por la fructosa 1,6-*bi*fosfato (figura 11.19, página 350) y son inhibidas por ATP. En ausencia de fructosa 1,6-*bi*fosfato, las concentraciones fisiológicas de ATP inhiben casi por completo a la enzima aislada. La presencia de fructosa 1,6-*bi*fosfato, que probablemente sea el modulador más importante *in vivo*, hace desplazar la curva hacia la izquierda. Cuando hay suficiente fructosa 1,6-*bi*fosfato, la curva se vuelve hiperbólica. La figura 11.18a muestra que la actividad enzimática es mayor en presencia del activador alostérico para diversas concentraciones de sustrato. Recuérdese que el fructosa 1, 6-*bi*fosfato es el producto de la reacción catalizada por la PFK-1. Su concentración aumenta cuando se eleva la actividad de la PFK-1. Como la fructosa 1,6-*bi*fosfato activa a



◀ Figura 11.17
Efecto del glucagón sobre la glicólisis en el hígado. La hormona glucagón es liberada en el páncreas, y va a la sangre cuando las concentraciones de glucosa son bajas. Cuando el glucagón se une a su receptor, se activa la proteína cinasa A por AMP cíclico a través de la ruta de señalización de adenilil cinasa. La proteína cinasa cataliza la fosforilación de la enzima bifuncional PFK-2, inhibiendo su actividad de cinasa y estimulando su actividad de fructosa 2,6-*bi*fosfatasa. Cuando la concentración de glucagón es alta, la formación del potente activador PFK-1 fructosa 2,6-*bi*fosfato disminuye y aumenta su degradación. El resultado es que la ruta principal, la glicólisis, se desacelera y se usa menos glucosa. También, el glucagón indica al hígado que aumente tanto la síntesis de glucosa como la movilización de glucosa desde el glucógeno.

la piruvato cinasa, la activación de PFK-1 (que cataliza el paso 3 de la ruta glicolítica) causa la activación siguiente de la piruvato cinasa (la última enzima en la ruta). Es un ejemplo de activación por acción anticipada.

La isozima predominante de la piruvato cinasa en el hígado y células intestinales de mamíferos está sujeta a un tipo adicional de regulación, la modificación covalente por fosforilación. La proteína cinasa A, la misma enzima que cataliza la fosforilación de PFK-2 (figura 11.17), cataliza también la fosforilación de la piruvato cinasa. La piruvato cinasa es menos activa en estado fosforilado. El cambio de comportamiento cinético se ve en la figura 11.18b, que muestra una gráfica de actividad de piruvato cinasa en células hepáticas e intestinales, en presencia y en ausencia de glucagón, estimulador de proteína cinasa A. La desfosforilación de la piruvato cinasa es catalizada por una proteína fosfatasa.



◀ Figura 11.18
Gráficas de velocidad inicial (v_0) en función de la concentración de fosfoenolpiruvato para piruvato cinasa. **a)** Para las isozimas en algunas células, la presencia de fructosa 1,6-*bi*fosfato desplaza la curva hacia la izquierda, indicando que la fructosa 1,6-*bi*fosfato es activador de las enzimas. **b)** Cuando las células hepáticas o intestinales se incuban con glucagón, se fosforila la piruvato cinasa por acción de la proteína cinasa A. La curva se desplaza hacia la derecha, lo que indica menos actividad de la piruvato cinasa.

Figura 11.19 ▲
Piruvato cinasa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae,* con el activador fructosa 1,6-*bi*fosfato (esferas parte inferior). El sitio activo está en el dominio central grande. [PDB 1A3W].

La actividad de la piruvato cinasa en el hígado disminuye con el hambre y aumenta al ingerir una dieta alta en carbohidratos. Esos cambios se deben a modificaciones en la velocidad de síntesis de piruvato cinasa.

E. El efecto Pasteur

Louis Pasteur observó que cuando las células de levadura crecen en forma anaeróbica, producen mucho más etanol y consumen mucho más glucosa que cuando crecen en forma aeróbica. De igual modo, el sistema musculoesquelético acumula ácido láctico bajo condiciones anaerobias, pero no cuando metaboliza en forma anaerobia a la glucosa. En las levaduras y en los músculos, la velocidad de conversión de glucosa a piruvato es mucho mayor bajo condiciones anaerobias. La desaceleración de la glicólisis en presencia de oxígeno se llama **efecto Pasteur**. Como se verá en el capítulo 13, el metabolismo aeróbico completo de una molécula de glucosa produce mucho más ATP que las dos moléculas de ATP que se producen sólo en la glicólisis. Por consiguiente, para determinada necesidad de ATP, se deben consumir menos moléculas de glucosa bajo condiciones aerobias. Las células detectan el estado de suministro y demanda de ATP, y modulan la glicólisis con varios mecanismos. Por ejemplo, la disponibilidad de oxígeno lleva a la inhibición de PFK-1 (y en consecuencia de la glicólisis), tal vez por disminución de AMP, que es activador de la PFK-1.

11.6 Entrada de otros azúcares a la glicólisis

La glucosa es el principal combustible metabólico en muchos organismos, pero algunos otros monosacáridos pueden ser absorbidos y usados como fuentes de energía. En esta sección se verá cómo se puede metabolizar fructosa, galactosa y manosa en la ruta glicolítica.

A. Conversión de fructosa en gliceraldehído 3-fosfato

La sacarosa es un disacárido que contiene fructosa, y el monosacárido fructosa, endulzante de muchos alimentos y bebidas, forma una fracción importante de carbohidratos en la dieta humana. Después de la absorción, la mayor parte de la fructosa es fosforilada en el hígado para forma fructosa 1-fosfato, por acción de una fructocinasa dependiente de ATP (figura 11.20). A continuación, la fructosa 1-fosfato aldolasa cataliza la escisión de la fructosa 1-fosfato a dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído. Después se fosforila el gliceraldehído a gliceraldehído 3-fosfato en una reacción catalizada por triosa cinasa, que consume una segunda molécula de ATP. La dihidroxiacetona fosfato se convierte en una segunda molécula de gliceraldehído 3-fosfato por acción de la triosa fosfato isomerasa.

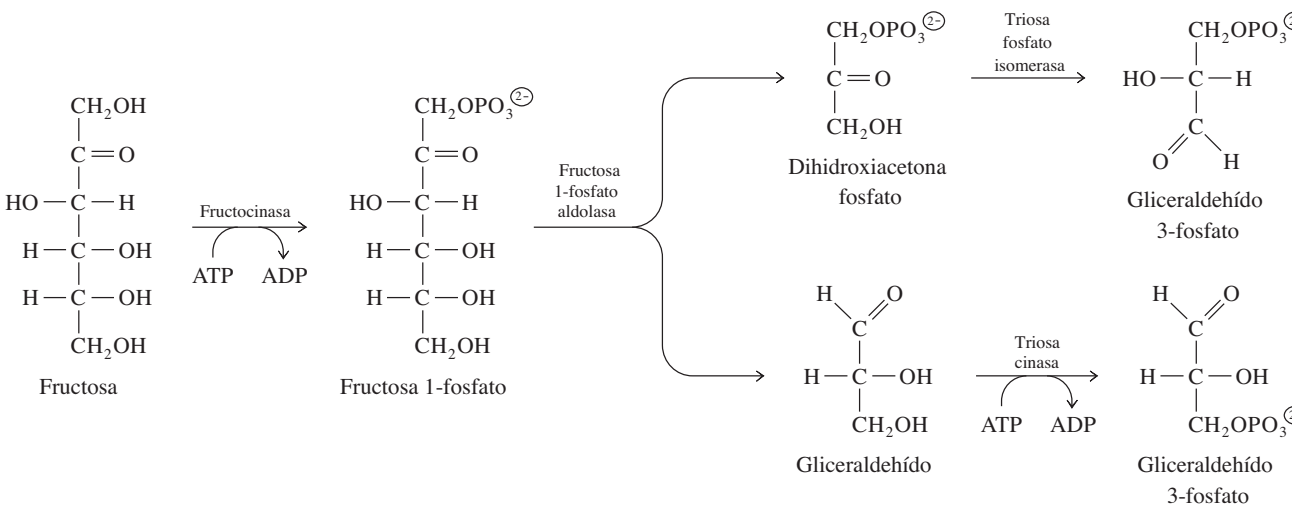


Figura 11.20 ▲
Conversión de fructosa en dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato.

Las dos moléculas producidas de gliceraldehído 3-fosfato se pueden metabolizar entonces a piruvato mediante los pasos siguientes de la glicólisis. El metabolismo de una molécula de fructosa a dos moléculas de piruvato produce una ganancia neta de dos moléculas de ATP y dos moléculas de NADH. Es el mismo rendimiento que la conversión de glucosa a piruvato. Sin embargo, en el catabolismo de la fructosa se salta la fosfofructocinasa-1 y su regulación asociada. Las dietas ricas en fructosa o sacarosa pueden llevar a un hígado grasoso por la sobreproducción de piruvato, que es precursor en la síntesis de grasas y colesterol.

B. Conversión de galactosa en glucosa 1-fosfato

El disacárido lactosa, presente en la leche, es una fuente principal para los mamíferos lactantes. En los recién nacidos, la lactasa intestinal cataliza la hidrólisis de lactosa para formar sus componentes, glucosa y galactosa, y ambos son absorbidos en el intestino, y transportados en el torrente sanguíneo. Algunas bacterias intestinales también pueden usar la lactosa como fuente de energía. En esas especies, la hidrólisis inicial de la lactosa es catalizada por β-galactosidasa.

Como se ve en la figura 11.21, la galactosa, epímero de la glucosa en C-4, puede convertirse en glucosa 1-fosfato por una ruta en la que se recicla el azúcar nucleótido UDP-glucosa (sección 7.3). Esta ruta existe en la mayor parte de las especies. En los mamíferos, la conversión de galactosa en glucosa 1-fosfato se efectúa en el hígado.

La galactocinasa cataliza la transferencia de un grupo fosforilo del ATP a la galactosa. La galactosa 1-fosfato formada en esta reacción se intercambia con la mitad de glucosa 1-fosfato en la UDP-glucosa, por ruptura del enlace pirofosfato de la UDP-glucosa. Esta reacción es catalizada por la galactosa 1-fosfato uridililtransferasa y produce glucosa 1-fosfato y UDP-galactosa. La glucosa 1-fosfato puede entrar a la glicólisis después de convertirse en glucosa 6-fosfato, en una reacción catalizada por fosfoglucomutasa. La UDP-galactosa se recicla a UDP-glucosa por acción de UDP-glucosa 4-epimerasa.

Se requiere UDP-galactosa para la biosíntesis de los gangliósidos (sección 16.11).

La conversión de una molécula de galactosa en dos moléculas de piruvato produce una ganancia neta de dos moléculas de ATP y dos moléculas de NADH, el mismo rendimiento que en las conversiones de glucosa y fructosa. La UDP-glucosa requerida se forma a partir de glucosa y el UTP equivalente al ATP, pero sólo se necesitan cantidades pequeñas (catalíticas) del mismo, ya que se recicla.

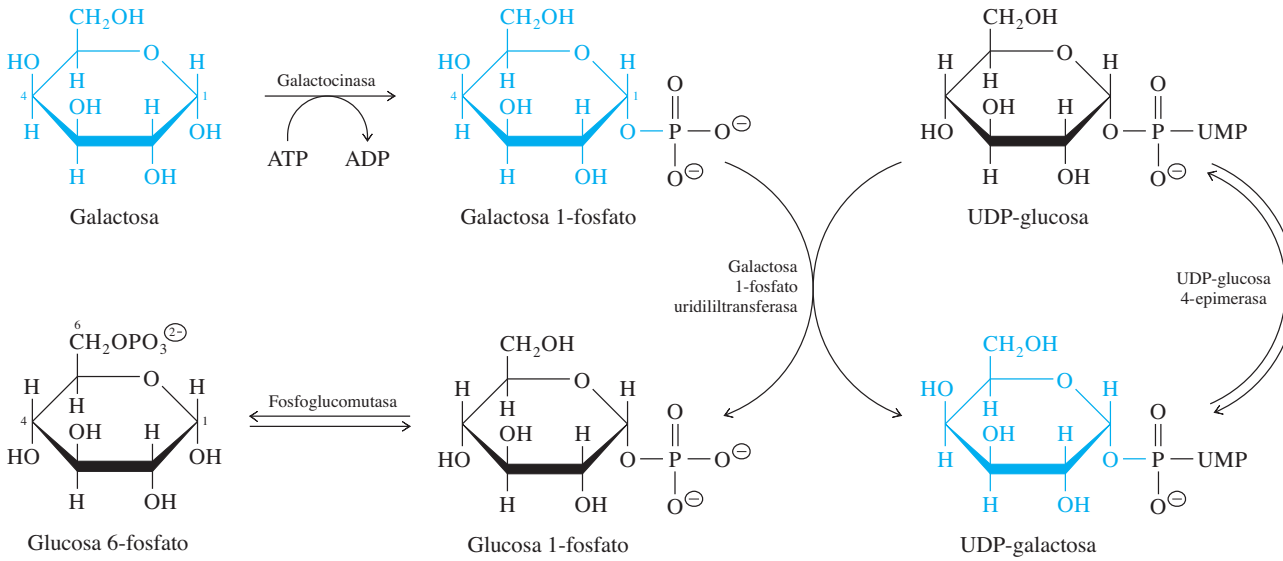


Figura 11.21 ▲
Conversión de galactosa en glucosa 6-fosfato. El intermedio metabólico, UDP-glucosa se recicla en el proceso. La estequiometría general de la ruta es galactosa + ATP ⟶ glucosa 6-fosfato + ADP.

Los niños alimentados con una dieta exclusiva de leche dependen del metabolismo de la galactosa para obtener 20% de sus necesidades calóricas. En la forma más común de la afección genética galactosemia (incapacidad de metabolizar bien la galactosa), los bebés tienen deficiencia de galactosa 1-fosfato uridililtransferasa. En esos casos se acumula galactosa 1-fosfato en las células. Eso puede afectar la función hepática, que se reconoce por la aparición de ictericia o tinción amarilla de la piel. Los daños al hígado son potencialmente fatales. Entre otros efectos están lesiones al sistema nervioso central. La prueba de galactosa 1-fosfato uridililtransferasa en los glóbulos rojos del cordón umbilical permite la detección de la galactosemia en el nacimiento. Muchos de los efectos más graves de esta deficiencia genética pueden mitigarse con una dieta especial que contenga muy poca galactosa y lactosa.

Aunque algunas personas conservan la capacidad de digerir la lactosa en toda su vida, la mayoría de los individuos sufren reducción en la concentración de lactasa más o menos a los cinco a siete años de edad. Este es el caso normal que se encuentra en la mayoría de los demás primates. Esto tiene paralelo con el cambio de la niñez, en que la leche materna es una fuente principal de alimento, a la adultez, donde no se consume la leche. En algunas poblaciones humanas, la producción de lactasa no cesa durante la adolescencia. Estas poblaciones han adquirido un gen mutante que continúa sintetizando lactasa en los adultos. El resultado es que los individuos en esas poblaciones pueden consumir productos lácteos durante toda su vida. Los pueblos del norte de Europa, y sus descendientes, tienen una alta proporción de adultos productores de lactasa. En los adultos deficientes en lactasa, la lactosa se metaboliza con las bacterias del intestino grueso, con producción de gases como CO_2 y H_2, y ácidos de cadena corta. Los ácidos pueden causar diarrea al aumentar la fuerza iónica del fluido intestinal. Las personas que no sintetizan lactasa suelen evitar la leche y los productos lácteos. Como no toleran dietas ricas en lácteos, son intolerantes a la lactosa. Algunos individuos intolerantes a la lactosa sí pueden tolerar el yogurt, donde la lactosa ha sido parcialmente hidrolizada por acción de una β-galactosidasa endógena del microorganismo en el cultivo del yogurt. Se puede usar un suplemento enzimático comercial que contiene β-galactosidasa de microorganismos para pretratamiento de la leche o para reducir el contenido de lactosa, o los individuos deficientes en lactasa lo pueden tomar cuando ingieren productos lácteos.

C. Conversión de manosa en fructosa 6-fosfato

La aldohexosa manosa se obtiene de la dieta en glucoproteínas y ciertos polisacáridos. La manosa se convierte en manosa 6-fosfato por acción de la hexocinasa. Para que entre a la ruta glicolítica, la manosa 6-fosfato sufre isomerización a fructosa 6-fosfato en una reacción catalizada por fosfomanosa isomerasa. Estas dos reacciones se ilustran en la figura 11.22.

11.7 La ruta Entner-Doudoroff en las bacterias

La ruta glicolítica clásica también se llama ruta Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). Esta ruta se encuentra en todos los eucariotas y en muchas especies de bacterias. Sin

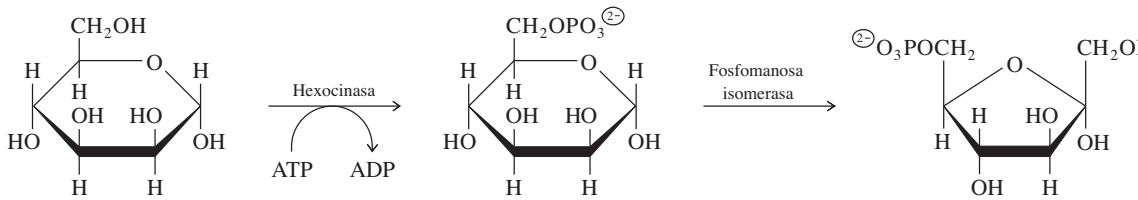


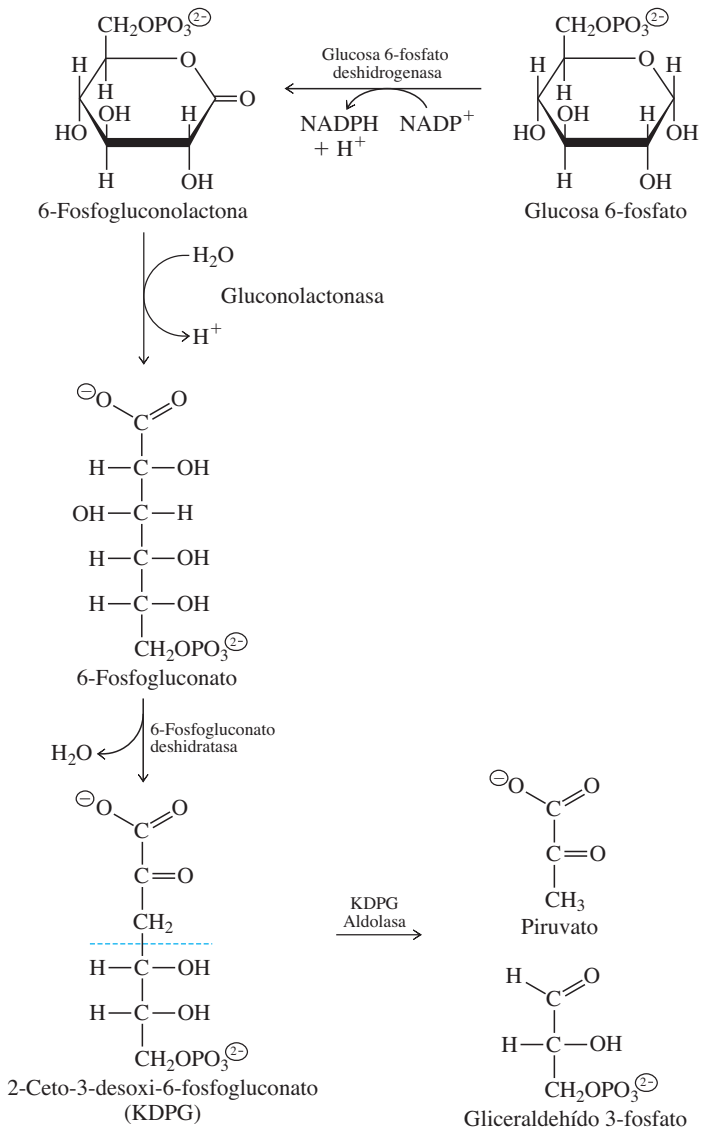
Figura 11.22 ▲
Conversión de manosa en fructosa 6-fosfato.

embargo, una gran cantidad de especies bacterianas no tienen fosfofructocinasa-1 y no pueden convertir glucosa 6-fosfato en fructosa 1,6-*bi*fosfato en la etapa de hexosa de la glicólisis.

La etapa de hexosa en la glucosa clásica puede evitarse en la ruta Entner-Doudoroff. La ruta comienza con la conversión de glucosa 6-fosfato en 6-fosfogluconato. Esta conversión es catalizada por dos enzimas, la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y la gluconolactonasa (figura 11.23). Ambas enzimas son comunes en casi todas las especies, porque se requieren en la ruta de las pentosas fosfato (sección 12.5). La oxidación de glucosa 6-fosfato por laglucosa 6-fosfato deshidrogenasa se acopla a la reducción de $NADP^{\oplus}$.

En el recuadro 12.2 se describirán las enfermedades metabólicas asociadas a la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa en el hombre.

El 6-fosfogluconato se convierte en 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato (KDPG, *keto-deoxi-phosphogluconate*) en una reacción excepcional de deshidrasa (deshidratasa). Entonces, el KDPG se escinde por acción de KDPG aldolasa en una molécula de piruvato y una molécula de gliceraldehído 3-fosfato. El producto final de la glicólisis es piruvato, y el gliceraldehído 3-fosfato puede convertirse en otra molécula de piruvato por la etapa de triosa en la glicólisis. Las enzimas de la etapa de triosa en la ruta EMP se encuentran en todas las especies, porque son esenciales para sintetizar la glucosa, y



◀ Figura 11.23
La ruta Entner-Doudoroff en las bacterias.

también en la glicólisis. Nótese que sólo una molécula del gliceraldehído 3-fosfato recorre la mitad inferior de la ruta glicolítica por cada molécula de glucosa 6-fosfato que entra a la ruta de Entner-Doudoroff. Eso quiere decir que sólo se produce una molécula de ATP por cada molécula de glucosa degradada en la ruta ED, en tanto que se sintetizan dos moléculas de ATP durante la glicólisis EMP. Se producen dos equivalentes reductores (NADH) durante la glicólisis EMP, y dos en la ruta ED (NADPH en la primera reacción y una molécula de NADH cuando se convierte gliceraldehído 3-fosfato en 1,3-*bi*fosfoglicerato).

Además de ser la ruta principal de degradación de glucosa en algunas especies, la ruta de Entner-Doudoroff también es importante en especies que poseen la ruta completa Embden-Meyerhoff-Parnas. La ruta Entner-Doudoroff se usa en el metabolismo de gluconato y otros ácidos orgánicos afines. Estos metabolitos no se pueden desviar hacia la ruta glicolítica normal. Muchas especies bacterianas, incluyendo *E. coli*, pueden crecer con gluconato como su única fuente de carbono. Bajo estas condiciones, la ruta principal de degradación, productora de energía, es la de Entner-Doudoroff.

Resumen

1. La glicólisis es una ruta de diez pasos, donde la glucosa se cataboliza a piruvato. Se puede dividir la glicólisis en una etapa de hexosa y una etapa de triosa. Los productos de la etapa de hexosa son gliceraldehído 3-fosfato y fosfato de dihidroxiacetona. Los fosfatos de triosa se interconvierten, y el gliceraldehído 3-fosfato se metaboliza a piruvato.

2. Por cada molécula de glucosa convertida en piruvato hay producción neta de dos moléculas de ATP a partir de ADP + P_i, y dos moléculas de NAD⊕ se reducen a NADH.

3. Bajo condiciones anaeróbicas en las levaduras, el piruvato se metaboliza a etanol y CO_2. En algunos otros organismos se puede convertir el piruvato en lactato, bajo condiciones anaeróbicas. Ambos procesos regeneran NAD⊕ a partir de NADH.

4. El cambio total de energía libre de Gibbs es negativo para la glicólisis. Los pasos catalizados por hexocinasa, fosfofructocinasa-1 y piruvato cinasa son metabólicamente irreversibles.

5. La glicólisis se regula en cuatro pasos: el transporte de glucosa hacia algunas células y las reacciones catalizadas por hexocinasa, fosfofructocinasa-1 y purivato cinasa.

6. Fructosa, galactosa y manosa pueden entrar a la ruta glicolítica convirtiéndose en metabolitos glucolíticos.

7. La ruta Entner-Doudoroff es una ruta alterna de catabolismo de glucosa en algunas bacterias.

Problemas

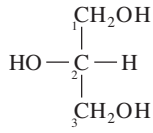
1. Calcule la cantidad de moléculas de ATP que se obtienen en la conversión anaeróbica de cada uno de los azúcares siguientes en lactato: a) glucosa, b) fructosa, c) manosa y d) sacarosa (paso metabólico inicial: sacarosa + $P_i \longrightarrow$ fructosa + glucosa 1-fosfato; glucosa 1-fosfato se isomeriza a glucosa 6-fosfato para entrar a la glicólisis).

2. a) Indique las posiciones de los seis carbonos de la glucosa en las dos moléculas de lactato que se forman en la glicólisis anaeróbica.
b) Bajo condiciones aeróbicas, el piruvato se puede descarboxilar y formar acetil-CoA y CO_2. ¿Cuáles carbonos de la glucosa se deben marcar con ^{14}C para obtener $^{14}CO_2$?

3. Si $^{32}P_i$ (es decir, fosfato marcado isotópicamente) se agrega a una preparación de hígado libre de células donde se efectúa la glicólisis, ¿se incorporará esta marca en algún intermedio o producto de la ruta glicolítica?

4. La enfermedad de Huntignton forma parte de la familia de enfermedades de "repetición de glutamina" que en los adultos maduros causa trastornos neurodegenerativos, que incluyen movimientos involuntarios y demencia. La proteína mutada causante de la enfermedad (proteína Huntington) contiene una región de poliglutamina con 40 a 120 glutaminas, que se cree que median una unión fuerte de esta proteína con gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Si el cerebro recurre casi exclusivamente a la glucosa como fuente de energía, sugiera un papel para la proteína Huntington en esta enfermedad.

5. Las grasas (triacilgliceroles) son una fuente importante de energía almacenada en los animales y se metabolizan inicialmente a ácidos grasos y glicerina. La glicerina se puede fosforilar por acción de una cinasa, y producir glicerol 3-fosfato, que se oxida y produce fosfato de dihidroxiacetona.
   a) Escriba las reacciones de la conversión de glicerina en dihidroxiacetona fosfato.
   b) La cinasa que actúa sobre la molécula proquiral de la glicerina es estereoespecífica, y lleva a la producción de L-glicerol 3-fosfato. ¿Cuáles carbonos del glicerol 3-fosfato se deben marcar con ^{14}C para que la glicólisis aeróbica obtenga acetil-CoA con ambos carbonos marcados?



Glicerina

6. En el tejido hepático, la insulina es un modulador positivo de la enzima glucocinasa. Si los pacientes con diabetes mellitus producen insulina insuficiente, explique por qué esos pacientes no pueden responder bien a aumentos de concentración de glucosa sanguínea.

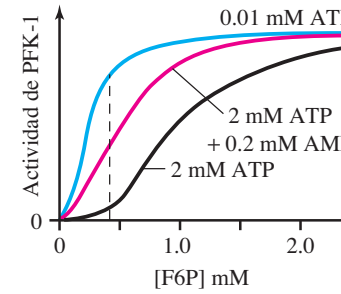
7. Las células tumorales carecen a menudo de una extensa red capilar, y deben funcionar bajo condiciones de suministro limitado de oxígeno. Explique por qué esas células cancerosas usan mucho más glucosa, y pueden producir cantidades excesivas de enzimas glicolíticas.

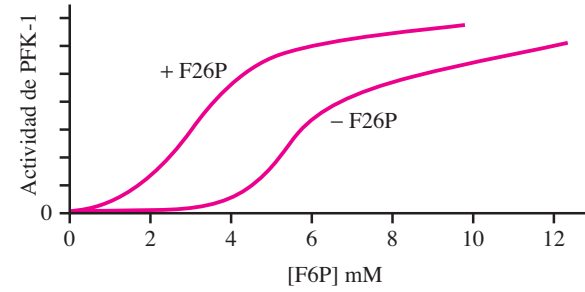
8. La glicólisis rápida durante el ejercicio extenuante proporciona el ATP necesario para la contracción muscular. Como la reacción de lactato deshidrogenasa no produce ATP alguno, ¿sería más eficiente la glicólisis si el producto final fuera piruvato y no lactato?

9. ¿Por qué se inhiben la hexocinasa y la fosfofructocinasa-1 por un análogo de ATP donde el átomo de oxígeno que une a los átomos de fósforo β y γ se sustituye por un grupo metileno (—CH2—)?

10. La $\Delta G°'$ para la reacción de aldolasa en los músculos es $+22.8$ kJ mol^{-1}. Si se considera lo anterior, ¿por qué la reacción de aldolasa se efectúa en la dirección del gliceraldehído 3-fosfato y de la dihidroxiacetona fosfato durante la glicólisis?

11. La gráfica que sigue muestra la velocidad de actividad de fosfofructocinasa-1 (PFK-1) de mamíferos, en función de la concentración de fructosa 6-fosfato (P6P): a) en presencia de ATP, AMP o ambos, y b) en ausencia o presencia de fructosa 2,6-*bi*fosfato (F26P). Explique estos efectos sobre las velocidades de reacción de la PFK-1.





12. Trace un diagrama que muestre la forma en que afecta un aumento de [cAMP] intracelular a la actividad de piruvato cinasa en las células hepáticas de mamíferos.

13. Como respuesta a bajas concentraciones de glucosa en la sangre, el páncreas produce glucagón, que dispara la ruta de señalización de adenilil ciclasa en las células hepáticas. El resultado es que disminuye el flujo por la ruta glicolítica.
   a) ¿Por qué es bueno para la glicólisis que disminuya en las células hepáticas como respuesta a bajas concentraciones de glucosa en la sangre?
   b) ¿Cómo se invierten los efectos del glucagón sobre la glicólisis cuando disminuye la concentración de glucagón como respuesta a concentraciones adecuadas de glucosa en la sangre?

Lecturas seleccionadas

Metabolismo de la glucosa

Cullis, P. M. (1987). Acyl group transfer-phosphoryl group transfer. En *Enzyme Mechanisms*, M. I. Page y A. Williams, eds. (London: Royal Society of Chemistry), pp. 178-220. Resume los mecanismos de cinasas, mutasas y fosfatasas.

Hamori, E. (1975). Illustration of free energy changes in chemical reactions. *J. Chem. Ed.* 52:370-373.

Hoffmann-Ostenhof, O., ed. (1987). *Intermediary Metabolism* (New York: Van Nostrand Reinhold). Esta colección de trabajos clásicos sobre metabolismo incluye el de Eduard Buchner.

Seeholzer, S. H., Jaworowski, A. y Rose, I. A. (1991). Enolpyruvate: chemical determination as a pyruvate kinase intermediate. *Biochemistry* 30:727-732. Proporciona la primera prueba del enolpiruvato en la reacción catalizada por la piruvato cinasa.

Regulación de la glicólisis

Depré, C., Rider, M. H. y Hue, L. (1998). Mechanisms of control of heart glycolisis. *Eur. J. Biochem*. 258:277-290. Describe el control de la glicólisis en el tejido cardiaco bajo diversas condiciones, que incluyen la carencia de oxígeno.

Engström, L., Ekman, P., Humble, E. y Zetterqvist, Ö. (1987). Pyruvate kinase. En *The Enzymes*, Vol. 18, P. D. Boyer y E. Krebs, eds. (San Diego: Academic Press), pp. 47-75. Describe la regulación de piruvato cinasa en el hígado de mamíferos.

Gould, G. W. y Holman, G. D. (1993). The glucose transport family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem. J.* 295:329-341.

Pessin, J. E., Thurmond, D. C., Elmendorf, J. S., Coker, K. J. y Okada, S. (1999). Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking. Location! Location! Location! *J. Biol. Chem*. 274: 2593-2596. Describe el mecanismo de activación de GLUT4 después de la estimulación con insulina.

Pilkis, S. J., Claus, T. H., Kurland, I. J. y Lange, A. J. (1995). 6-Phosphofructo-2-kinase-/fructose-2,6-*bis*phosphatase: a metabolic signaling enzyme. *Annu. Rev. Biochem.* 64:799-835. Repasa la regulación del metabolismo de fructosa 2,6-*bi*fosfato mediante esta enzima bifuncional.

Pilkis, S. J., El-Maghrabi, M. R. y Claus, T. H. (1988). Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 57:755-783.

Pilkis, S. J. y Granner, D. K. (1992). Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 885-909.

Van Schaftingen, E. (1993). Glycolysis revisited. *Diabetologia* 36:581-588. Repasa la regulación de glicólisis mediante fructosa 2,6-*bi*fosfato y la proteína reguladora glucocinasa.

Yamada, K. y Noguchi, T. (1999). Nutrient and hormonal regulation of pyruvate kinase gene expression. *Biochem. J.* 337:1-11.

Metabolismo de otros azúcares

Frey, P. A. (1996). The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. *FASEB J.* 10:461-470. Presenta detalles enzimáticos de la conversión de galactosa en fosfato de glucosa.

12

capítulo doce

Gluconeogénesis, la ruta de la pentosa fosfato y el metabolismo del glucógeno

Ya se ha visto que el catabolismo de la glucosa es básico en el metabolismo celular de la energía. En este capítulo se describirá la biosíntesis de la glucosa y de otros carbohidratos. Todas las especies pueden sintetizar glucosa a partir de precursores simples de dos y tres carbonos mediante gluconeogénesis (literalmente, la formación de nueva glucosa). Algunas especies, en forma notable los organismos fotosintéticos, pueden fabricar estos precursores fijando el dióxido de carbono (capítulo 15). Esto conduce a la síntesis neta de glucosa a partir de compuestos inorgánicos. En la descripción de la gluconeogénesis se debe considerar que toda molécula de glucosa que se use en la glicólisis debió ser sintetizada por alguna especie.

La ruta de la gluconeogénesis comparte algunos pasos con la glicólisis, que es la ruta de degradación de la glucosa. Hay cuatro reacciones específicas de la ruta de la gluconeogénesis que reemplazan a las tres reacciones de glicólisis, metabólicamente irreversibles. Este conjunto opuesto de reacciones es un ejemplo de rutas separadas y reguladas para síntesis y degradación (sección 10.2).

Además de respaldar la producción de ATP (mediante glicólisis y el ciclo del ácido cítrico), la glucosa produce equivalentes reductores en forma de NADPH para reacciones de biosíntesis. La glucosa también es un precursor de las mitades de ribosa y desoxirribosa en los nucleótidos y desoxinucleótidos. La ruta de las pentosas fosfato se encarga de la síntesis de ribosa y de producir equivalentes reductores en forma de NADPH.

La disponibilidad de la glucosa se controla regulando la absorción y síntesis de glucosa y moléculas afines, y mediante regulación de la síntesis y degradación de polisacáridos de almacenamiento formados por residuos de glucosa. La glucosa se almacena en forma de glucógeno en bacterias y animales, y como almidón en las plantas. El glucógeno y el almidón se pueden degradar intracelularmente para liberar monómeros

Arriba: La insulina, una hormona polipéptido de 51 residuos que regula el metabolismo de carbohidratos y lípidos. Las moléculas de insulina pueden cristalizar como unidades diméricas, pero la insulina es un monómero cuando está en solución.

de glucosa. Los monómeros de glucosa pueden sostener la producción de energía a través de la glicólisis, o servir como precursores en reacciones de biosíntesis. El metabolismo del glucógeno es otro ejemplo de rutas opuestas y reguladas.

En los mamíferos, la gluconeogénesis, la ruta de las pentosas fosfato y el metabolismo del glucógeno están regulados en forma estrecha y coordinada de acuerdo con los requisitos del organismo, que varían de un momento a otro. En este capítulo se repasarán estas rutas y se examinarán algunos de los mecanismos para regular el metabolismo de la glucosa en las células de mamíferos.

12.1 Gluconeogénesis

Todos los organismos tienen una ruta de biosíntesis de glucosa, o gluconeogénesis. Esto es válido incluso para animales que usan glucosa exógena como fuente importante de energía. No siempre puede estar disponible la glucosa de fuentes externas o de reservas intracelulares. Por ejemplo, los grandes mamíferos que no han comido durante 16 a 24 horas han agotado sus reservas de glucógeno en el hígado. Ciertos tejidos en los mamíferos, en especial de hígado y riñones, pueden sintetizar glucosa a partir de precursores simples, como lactato y alanina. Bajo condiciones de ayuno, la gluconeogénesis suministra casi toda la glucosa al organismo. Se requiere la glucosa para metabolismo en ciertos tejidos, como en el cerebro. Durante el ejercicio, los músculos convierten a la glucosa en piruvato y lactato, que van al hígado y son convertidos en glucosa. El cerebro y los músculos consumen mucha de la glucosa recién formada. Las bacterias pueden convertir numerosos nutrientes a ésteres de glucosa fosfato y a glucógeno.

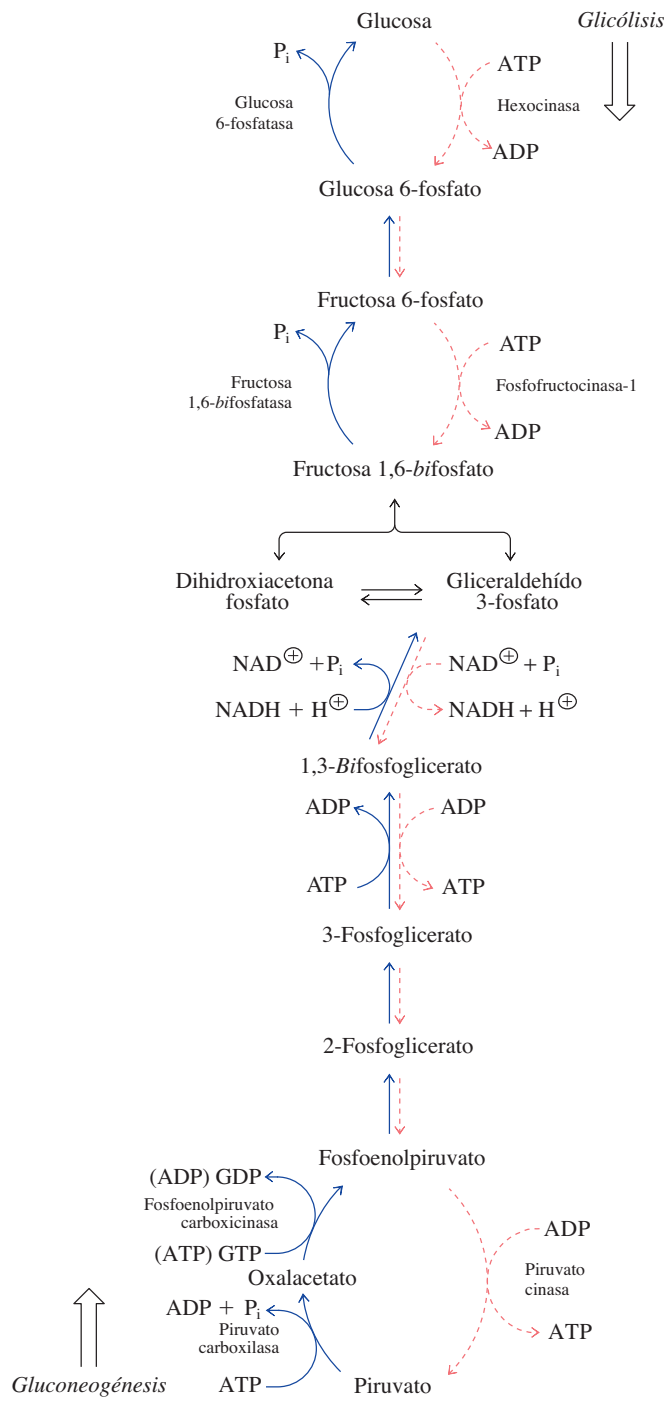
Lo más conveniente es considerar que el piruvato es el punto inicial para la síntesis de glucosa. En la figura 12.1 se compara la ruta de la gluconeogénesis a partir del piruvato con la ruta glucolítica. Muchos de los compuestos intermedios y de las enzimas son idénticos. Las siete reacciones cercanas al equilibrio en la glicólisis se efectúan en dirección inversa durante la gluconeogénesis. Las reacciones enzimáticas, exclusivas de la gluconeogénesis, se requieren para las tres reacciones metabólicamente irreversibles de la glicólisis. Esas reacciones glucolíticas irreversibles son catalizadas por piruvato cinasa, fosfofructocinasa-1 y hexocinasa. En la dirección de biosíntesis, esas reacciones son catalizadas por diferentes enzimas. Ya que la ruta de síntesis de glucosa evolucionó primero, es adecuado imaginar que las enzimas glucolíticas son enzimas de salto o derivación de pasos (*bypass*). Esas enzimas, en especial la fosfofructocinasa-1, evolucionaron para saltarse las reacciones metabólicamente irreversibles de la gluconeogénesis.

En la siguiente sección se describirá cómo entran otros precursores a la ruta.

La síntesis de una molécula de glucosa a partir de dos de piruvato requiere cuatro moléculas de ATP y dos de GTP (en animales), así como dos moléculas de NADH. La ecuación neta para la gluconeogénesis es

$$2\ \text{Piruvato} + 2\ \text{NADH} + 4\ \text{ATP} + 2\ \text{GTP} + 6\ \text{H}_2\text{O} + 2\ \text{H}^{\oplus} \longrightarrow$$
$$\text{Glucosa} + 2\ \text{NAD}^{\oplus} + 4\ \text{ADP} + 2\ \text{GDP} + 6\ \text{P}_i \qquad \textbf{(12.1)}$$

Se necesitan cuatro equivalentes de ATP para superar la barrera termodinámica de la formación de dos moléculas del fosfoenolpiruvato, compuesto rico en energía, a partir de dos moléculas de piruvato. Recuérdese que en la glicólisis, la conversión de fosfoenolpiruvato a piruvato es una reacción metabólicamente irreversible catalizada por piruvato cinasa. En la dirección catabólica, esta reacción se acopla a la síntesis de ATP. Se requieren dos moléculas de ATP para efectuar la inversa de la reacción glucolítica catalizada por fosfoglicerato cinasa. En la etapa de hexosa de la gluconeogénesis, no se recupera energía en los pasos que convierten la fructosa 1,6-*bi*fosfato a glucosa, porque la fructosa 1,6-*bi*fosfato no es un intermedio de alta energía. La glicólisis consume dos moléculas de ATP y genera cuatro, con un rendimiento neto de dos equivalentes de ATP y dos moléculas de NADH. La síntesis de una molécula de glucosa en la gluconeogénesis consume un total de seis equivalentes de ATP y dos moléculas de



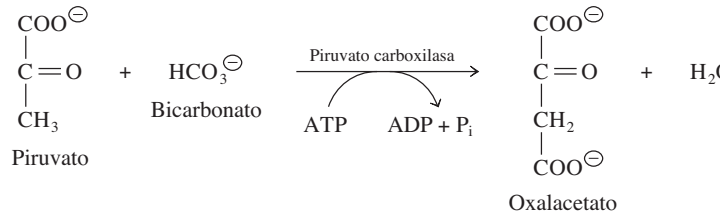
◀Figura 12.1
Comparación de gluconeogénesis y glicólisis. Hay cuatro reacciones metabólicamente irreversibles en la gluconeogénesis (en gris). Son las que catalizan tres diferentes enzimas en dirección inversa a la de la glicólisis (línea punteada). Las dos rutas tienen una etapa de triosa y una de hexosa. Por consiguiente, se requieren dos moléculas de piruvato para producir una molécula de glucosa.

NADH. Como era de esperar, la biosíntesis de la glucosa requiere energía, y su degradación libera energía.

A. Piruvato carboxilasa

El examen de los pasos individuales comenzará en la conversión de piruvato a glucosa con las dos enzimas que se requieren para la síntesis del fosfoenolpiruvato. Los dos pasos consisten en una carboxilación seguida por descarboxilación. En el primer paso,

la piruvato carboxilasa cataliza la conversión de piruvato en oxalacetato. La reacción se acopla a la hidrólisis de una molécula de ATP.



(12.2)

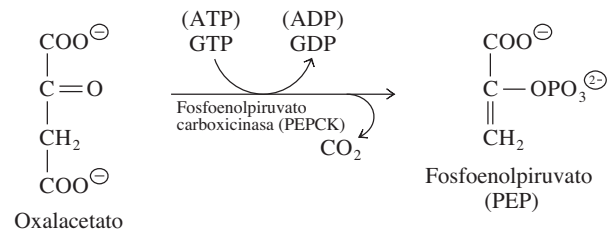
La piruvato carboxilasa es una enzima compleja grande, formada por dos subunidades idénticas. Cada subunidad tiene un grupo prostético de biotina unido en forma covalente a un residuo de lisina. Se requiere la biotina para la adición de bicarbonato al piruvato. La piruvato carboxilasa cataliza una reacción metabólicamente irreversible, y puede activarse de manera alostérica por la acetil-CoA. Es el único mecanismo regulador conocido para la enzima. La acumulación de acetil-CoA indica que no se está metabolizando en forma eficiente mediante el ciclo del ácido nítrico. La piruvato carboxilasa se estimula para dirigir al piruvato hacia el oxalacetato, y no la acetil-CoA. El oxalacetato puede entrar al ciclo del ácido cítrico o servir como precursor en la biosíntesis de la glucosa.

El bicarbonato es uno de los sustratos en la reacción 12.2. Se forma cuando se disuelve el dióxido de carbono en agua y a veces la reacción se escribe como si el CO_2 fuera el sustrato. La reacción de piruvato carboxilasa tiene una función importante en la fijación de dióxido de carbono en bacterias y algunos eucariotas. Esta función puede no ser tan obvia al examinar la gluconeogénesis, ya que el dióxido de carbono se libera en la reacción inmediata. Sin embargo, mucho del oxalacetato que se produce no se usa en la gluconeogénesis. Más bien reabastece la reserva de intermedios en el ciclo del ácido cítrico que sirven como precursores en la biosíntesis de aminoácidos y lípidos (sección 13.7).

El mecanismo de reacción para la piruvato carboxilasa se describió en la sección 7.9.

B. Fosfoenolpiruvato carboxicinasa

La fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK, *phosphoenolpyruvate carboxykinase*) cataliza la conversión de oxalacetato en fosfoenolpiruvato.



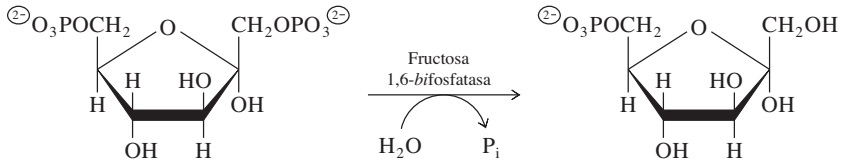
(12.3)

Hay dos versiones distintas de PEPCK. La enzima que contiene bacterias, protistas, hongos y plantas usa ATP como donador de grupo fosforilo en la reacción de descarboxilación. La versión de animales usa GTP. En la mayor parte de las especies, la enzima no tiene propiedades cinéticas alostéricas ni moduladores fisiológicos conocidos. Su actividad se modifica con mayor frecuencia mediante controles a nivel de transcripción de su gen. El nivel de actividad de PEPCK en las células influye sobre la velocidad de gluconeogénesis. Esto vale en especial en los mamíferos, donde la gluconeogénesis sucede principalmente en las células del hígado, riñones e intestino delgado. Durante el ayuno en los animales, la liberación prolongada de glucagón en el páncreas lleva a una elevación de cAMP intracelular, que da lugar a una mayor transcripción del gen PEPCK en el hígado, y mayor síntesis de PEPCK. Esta activación de expresión de gen por una hormona se llama inducción hormonal. Después de varias horas, aumenta la cantidad de PEPCK y la rapidez de la gluconeogénesis. La insulina, abundante en el estado saciado, actúa en oposición al glucagón a nivel del gen, reduciendo la rapidez de síntesis de PEPCK.

La síntesis de fosfoenolpiruvato en dos pasos, a partir de piruvato, es común en la mayor parte de los eucariotas, incluyendo al hombre. Es la razón principal de que se muestre cuando se describe la gluconeogénesis (figura 12.1). Sin embargo, muchas especies de bacterias pueden convertir el piruvato directo a fosfoenolpiruvato en una reacción dependiente de ATP y catalizada por fosfoenolpiruvato sintasa. Esta es una ruta mucho más eficaz que la de dos pasos en los eucariotas, catalizada por piruvato carboxilasa y PEPCK. La presencia de fosfoenolpiruvato sintasa en células bacterianas se debe a que la gluconeogénesis eficiente es mucho más importante en las bacterias que en los eucariotas, ya que la mayor parte de las bacterias no se pueden basar en una fuente exógena de glucosa.

C. Fructosa 1,6-*bi*fosfatasa

Las reacciones de gluconeogénesis entre fosfoenolpiruvato y fructosa 1,6-*bi*fosfato sólo son la inversa de las reacciones casi en equilibrio de la glicólisis. Sin embargo, la reacción glucolítica catalizada por la fosfofructocinasa-1 es metabólicamente irreversible. En la dirección de biosíntesis, esta reacción es catalizada por la tercera enzima específica de la gluconeogénesis, la fructosa 1,6-*bi*fosfatasa. Esta enzima cataliza la conversión de fructosa 1,6-*bi*fosfato a fructosa 6-fosfato.



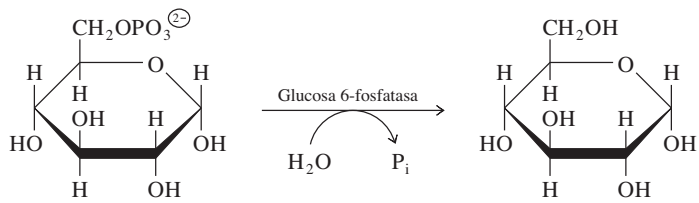
Fructosa 1,6-*bi*fosfato — Fructosa 6-fosfato **(12.4)**

En esta reacción, la hidrólisis del éster fosfato se asocia a un gran cambio negativo de energía libre de Gibbs (ΔG), que hace que esta reacción sea metabólicamente irreversible. La enzima en los mamíferos presenta cinética sigmoidal, y es inhibida de manera alostérica por AMP y por la molécula reguladora de fructosa 2,6-*bi*fosfato. Recuérdese que la fructosa 2,6-*bi*fosfato es un potente activador de la fosfofructocinasa-1, la enzima que cataliza la formación de fructosa 1,6-*bi*fosfato en la glicólisis (sección 11.5C). Así, las dos enzimas que catalizan la interconversión de la fructosa 6-fosfato y la fructosa 1,6-*bi*fosfato son controladas en forma recíproca por la concentración de fructosa 2,6-*bi*fosfato.

Las reacciones opuestas de fosfofructocinasa-1 y fructosa 1,6-*bi*fosfatasa forman un ciclo de sustrato que se describe en la sección 12.3.

D. Glucosa 6-fosfatasa

El paso final de la gluconeogénesis es la hidrólisis de la glucosa 6-fosfato para formar glucosa. La enzima es glucosa 6-fosfatasa.



Glucosa 6-fosfato — Glucosa **(12.5)**

Esta es una reacción hidrolítica metabólicamente irreversible.

Aunque se presenta a la glucosa como producto final de la gluconeogénesis, eso no es cierto en todas las especies. En la mayor parte de los casos, la ruta biosintética termina con la glucosa 6-fosfato. Este producto es una forma activada de glucosa. Se convierte

en el sustrato para más rutas de carbohidrato que llevan a la síntesis de glucógeno (sección 12.5), almidón y sacarosa (sección 15.11), pentosas (sección 12.4) y otras hexosas.

En los mamíferos, la glucosa es un producto final importante de la gluconeogénesis, porque sirve como fuente importante de energía para la glicólisis en muchos tejidos. La glucosa se fabrica en las células de hígado, riñones e intestino delgado, y se exporta al torrente sanguíneo. En esas células, la glucosa 6-fosfatasa está enlazada al retículo endoplásmico con su sitio activo en el lumen. La enzima es parte de un complejo que incluye a un transportador de glucosa 6-fosfato (G6PT) y un transportador de fosfato. El G6PT mueve a la glucosa 6-fosfato del citosol al interior del retículo, donde es hidrolizado a glucosa y fosfato inorgánico. El fosfato regresa al citosol y la glucosa se transporta a la superficie celular (y al torrente sanguíneo) a través de la ruta de secreción.

Los defectos en la transferencia de glucosa 6-fosfatasa o glucosa 6-fosfato causan la enfermedad de Gierke (recuadro 12.3 en sección 12.6).

Los demás enzimas necesarias para la gluconeogénesis se encuentran, al menos en pequeños cantidades, en muchos tejidos normales. En contraste, la glucosa 6-fosfatasa sólo se encuentra en célular del hígado, riñones e intestino del gado, así que sólo esos tejidos pueden sintetizar glucosa libre. Las células de los tejidos que carecen de glucosa 6-fosfatasa la conservan para el metabolismo interno de darbohidratos.

12.2 Precursores para la gluconeogénesis

Los sustratos principales para la síntesis de la glucosa 6-fosfato son piruvato, compuestos intermedios del ciclo del ácido cítrico, intermedios de tres carbonos en la ruta (por ejemplo, gliceraldehído 3-fosfato) y compuestos con dos carbonos como acetil-CoA. La acetil-CoA se convierte en oxaloacetato en el ciclo del glioxilato, que funciona en bacterias, protistas, hongos, plantas y algunos animales (sección 13.8). Los principales precursores para la gluconeogénesis en los mamíferos son lactato y la mayor parte de los aminoácidos, en especial alanina. La glicerina, que se produce por hidrólisis de los triacilgliceroles, también es un sustrato para la gluconeogénesis. La glicerina entra a la ruta después de su conversión a dihidroxiacetona fosfato. Los precursores que se producen en los tejidos no gluconeogenéticos deben transportarse primero al hígado para ser sustratos en la gluconeogénesis.

A. Lactato

En la glicólisis se generan grandes cantidades de lactato en los músculos activos, y los glóbulos rojos producen lactato en forma continua. El lactato de estas y otras fuentes entra al torrente sanguíneo y llega al hígado, donde se convierte en piruvato por acción de la lactato deshidrogenasa. El piruvato puede entonces ser un sustrato para la gluconeogénesis. La glucosa producida por el hígado entra al torrente sanguíneo para ser entregada a los tejidos periféricos. A esta secuencia se le llama **ciclo de Cori** (figura 12.2). Este ciclo metabólico opera sin pérdida ni ganancia de glucosa. La conversión de

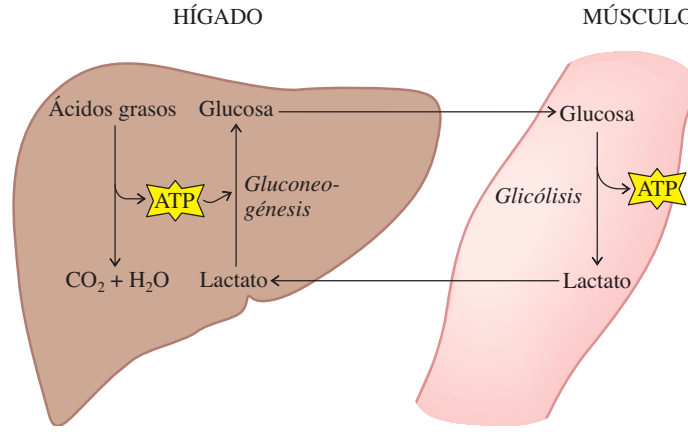
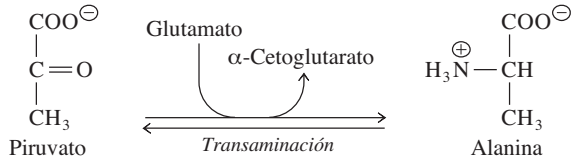


Figura 12.2 ▶
Ciclo de Cori: catabolismo de glucosa a L-lactato en tejidos periféricos, conducción del lactato al hígado, formación de glucosa a partir de lactato en el hígado y regreso de glucosa a tejidos periféricos.

lactato en glucosa requiere energía, que en su mayor parte se deriva de la oxidación de ácidos grasos en el hígado. Así, el ciclo de Cori transfiere energía potencial química en forma de glucosa, del hígado a los tejidos periféricos.

B. Aminoácidos

Los esqueletos de carbono en la mayor parte de los aminoácidos son catabolizados a piruvato o a compuestos intermedios en el ciclo del ácido cítrico. Los productos finales de estas rutas catabólicas pueden servir directamente como precursores para la síntesis de glucosa 6-fosfato en las células capaces de efectuar la gluconeogénesis. En los tejidos periféricos de los mamíferos, el piruvato formado por glicólisis o por catabolismo de aminoácidos debe ser transportado al hígado antes de usarse en la síntesis de glucosa. El ciclo de Cori es una forma de lograr esta transferencia, convirtiendo piruvato en lactato en los músculos, y volviéndolo a convertir en piruvato en las células hepáticas. El ciclo de glucosa-alanina es un sistema parecido de transporte (sección 17.7C). El piruvato puede aceptar un grupo amino de un α-aminoácido, como glutamato, para formar alanina con el proceso de transaminación (sección 7.8).



(12.6)

La alanina va al hígado donde sufre transaminación con α-cetoglutarato a fin de volver a formar piruvato para la gluconeogénesis. Los aminoácidos se convierten en una de las fuentes principales de carbono para gluconeogénesis durante el ayuno, cuando se agota el suministro de glucógeno.

El esqueleto de carbono del aspartato, que es el donador de grupo amino en el ciclo de la urea (una ruta que elimina el exceso de nitrógeno de la célula, como se describirá en la sección 17.7C), también es un precursor de la glucosa. El aspartato se convierte en fumarato en el ciclo de la urea; el fumarato se hidrata a malato, que se oxida a oxalacetato. Además, la transminación de aspartato con α-cetoglutarato genera oxalacetato en forma directa.

C. Glicerol

El catabolismo de los triacilgliceroles produce glicerol y acetil-CoA. Como se mencionó antes, la acetil-CoA contribuye a la formación neta de glucosa por reacciones del ciclo del glioxilato (sección 13.7). El ciclo del glioxilato no contribuye a la síntesis neta de glucosa a partir de lípidos en las células de mamíferos. Sin embargo, el glicerol se puede convertir en glucosa en una ruta que comienza con la fosforilación a glicerol 3-fosfato, catalizada por glicerol cinasa (figura 12.3, de la página siguiente). El glicerol 3-fosfato entra a la gluconeogénesis después de convertirse en dihidroxiacetona fosfato. Esta oxidación se puede catalizar con complejo de glicerol 3-fosfato deshidrogenasa y flavina, embebido en la membrana mitocondrial interna. La cara externa de esta enzima se enlaza a glicerol 3-fosfato, y los electrones se pasan a la ubiquinona (Q), y después al resto de la cadena de transporte de electrones asociada a la membrana. La oxidación del glicerol 3-fosfato también se puede catalizar con la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa citosólica, y en este caso el NADH es un coproducto. Ambas reacciones suceden en el hígado, el lugar de la mayor parte de la gluconeogénesis en los mamíferos.

D. Propionato y lactato

En los rumiantes, incluyendo vacunos, ovejas, jirafas, venados y camellos, el propionato y el lactato producido por los microorganismos en el rumen (estómago de cámaras) son absorbidos y metabolizados en gran parte a glucosa. El propionato se convierte en propionil-CoA y después en succinil-CoA. Estas reacciones se describirán en el capítu-

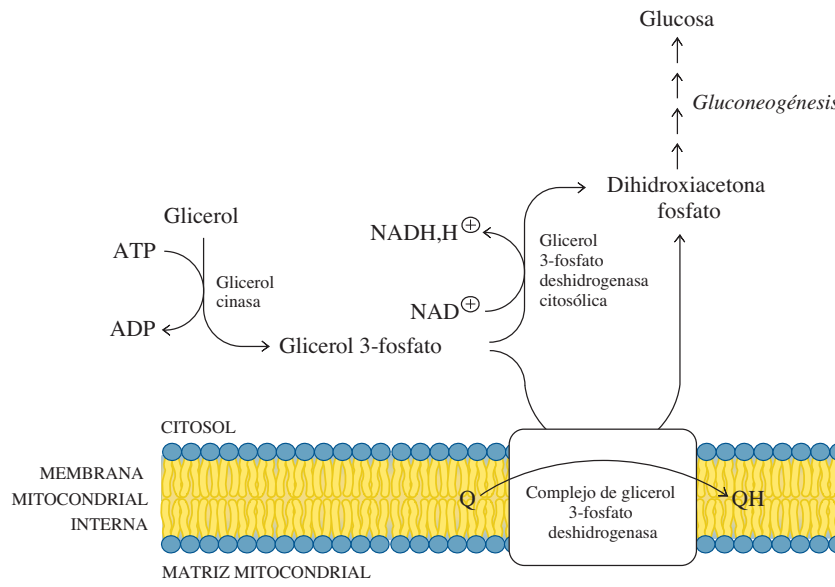


Figura 12.3 ▶
Gluconeogénesis a partir de glicerol. El glicerol 3-fosfato se puede oxidar en reacciones catalizadas por una de dos deshidrogenasas; ambas reacciones producen coenzimas reducidas. El hígado contiene ambas deshidrogenasas, por lo que las dos reacciones se pueden efectuar allí.

lo sobre metabolismo de lípidos (sección 16.3). La succinil-CoA es un intermedio en el ciclo del ácido cítrico que se puede metabolizar y formar oxalacetato. El lactato del rumen se oxida a piruvato.

E. Acetato

Muchas especies pueden usar acetato como fuente principal de carbono. Estas especies pueden convertir el acetato en acetil-CoA, que puede ser el precursor para el oxalacetato. Las bacterias y los eucariotas unicelulares, como las levaduras, usan el acetato como precursor para la gluconeogénesis. Algunas especies de bacterias pueden sintetizar al acetato en forma directa a partir de CO_2. En ellas, la ruta de gluconeogénesis les proporciona una forma de sintetizar glucosa a partir de sustratos inorgánicos.

12.3 Regulación de la gluconeogénesis

La gluconeogénesis se controla cuidadosamente *in vivo*. La glicólisis y la gluconeogénesis son rutas opuestas, catabólica y anabólica, que comparten algunos pasos enzimáticos. Sin embargo, algunas reacciones son únicas para cada ruta. Por ejemplo, la fosfofructocinasa-1 cataliza una reacción en la glicólisis, y la fructosa 1,6-*bi*fosfatasa cataliza la reacción contraria en la gluconeogénesis, y ambas reacciones son metabólicamente irreversibles. Por lo regular, sólo una de las reacciones se efectúa en forma importante. Bajo algunas condiciones, las enzimas operan al mismo tiempo, y la reacción neta es la hidrólisis de ATP a ADP y P_i.

$$\begin{array}{rrcl} & \text{Fructosa 6-fosfato} + \text{ATP} & \longrightarrow & \text{Fructosa 1,6-}\textit{bi}\text{fosfato} + \text{ADP} \\ & \text{Fructosa 1,6-}\textit{bi}\text{fosfato} + \text{H}_2\text{O} & \longrightarrow & \text{Fructosa 6-fosfato} + \text{P}_i \\ \hline \text{Net} & \text{ATP} + \text{H}_2\text{O} & \longrightarrow & \text{ADP} + \text{P}_i \end{array} \qquad \textbf{(12.7)}$$

El par de reacciones se llama **ciclo del sustrato**, porque un sustrato entra y sale en las dos reacciones. La presencia de un ciclo del sustrato hace bajar el flujo neto por una ruta, pero también puede constituir un punto para regular el flujo.

La regulación de la gluconeogénesis a corto plazo (la que sucede en minutos, y no implica la síntesis de proteínas nuevas) se ejerce en dos sitios: el sustrato va y viene

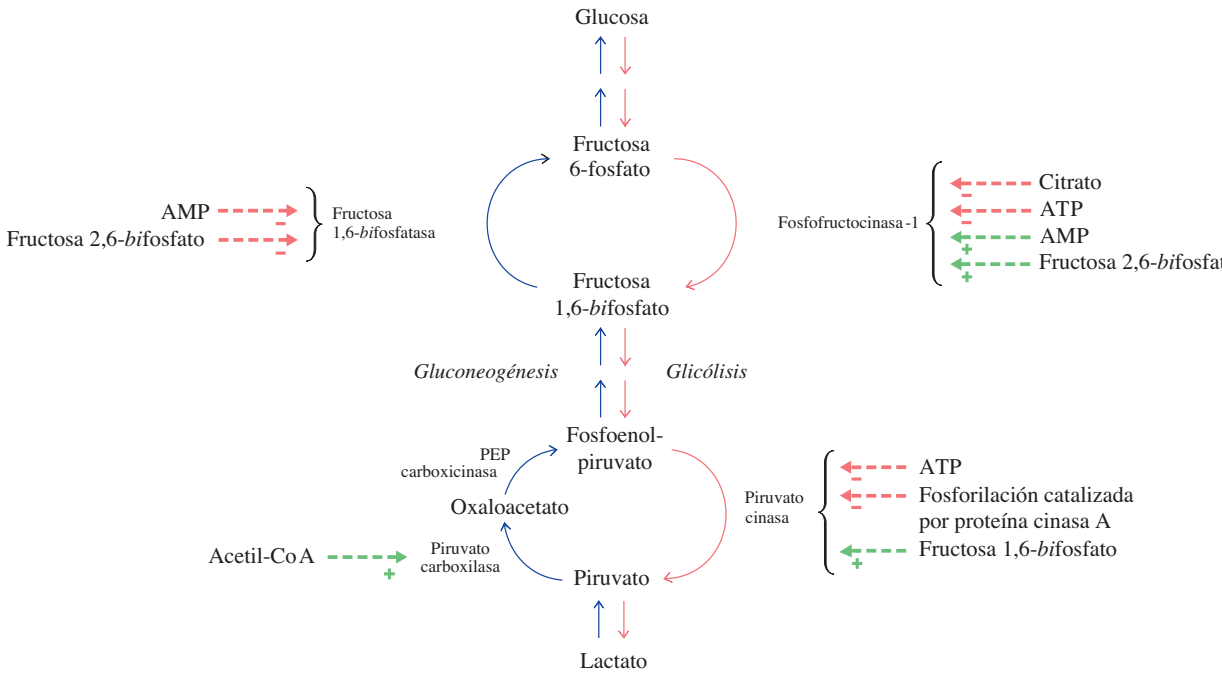


Figura 12.4 ▲
Regulación de la glicólisis y la gluconeogénesis en el hígado. Los ciclos de sustrato se efectúan entre fructosa 6-fosfato y fructosa 1,6-*bi*fosfato, y entre fosfoenolpiruvato y piruvato. El cambio de actividad de cualquiera de las enzimas en los ciclos de sustrato puede afectar no sólo a la tasa de flujo, sino también a la dirección del flujo, que puede ser hacia la glicólisis o hacia la gluconeogénesis. El efecto neto es una mayor regulación a costa de la hidrólisis del ATP.

entre piruvato y fosfoenolpiruvato, y entre fructosa 1,6-*bi*fosfato y fructosa 6-fosfato (figura 12.4). La modulación de la actividad de cualquier enzima en un ciclo de sustrato puede alterar el flujo a través de las dos rutas opuestas. Por ejemplo, si se inhibe la fosfofructocinasa-1 se estimula la gluconeogénesis. En otras palabras, entra más fructosa 6-fosfato a la ruta que lleva a la glucosa, en lugar de convertirse en fructosa 1,6-*bi*fosfato. El control simultáneo de la fructosa 1,6-*bi*fosfatasa también regula el flujo de fructosa 1,6-*bi*fosfato hacia la glicólisis o hacia la gluconeogénesis. Un aumento en el modulador fructosa 2,6-*bi*fosfato tiene dos efectos recíprocos: estimula la glicólisis y también inhibe la gluconeogénesis.

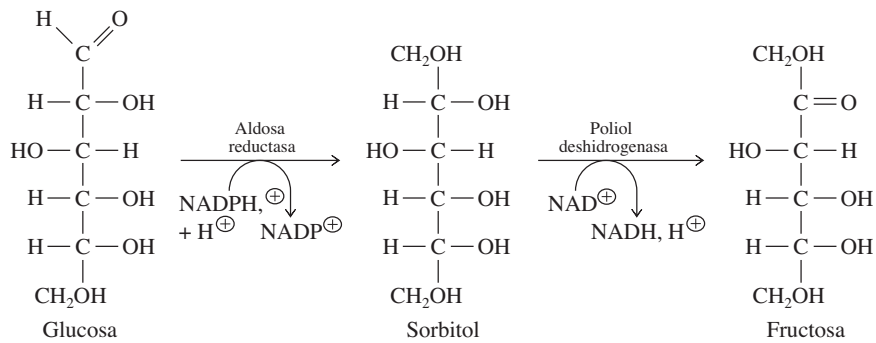
Además de los compuestos que se ven en la figura 12.4, la hormona glucagón es un regulador del ciclo del sustrato fructosa 6-fosfato-fructosa 1,6-*bi*fosfato. Cuando baja la concentración de glucosa en la sangre, la liberación de glucagón dispara una mayor actividad de proteína cinasa A. La proteína cinasa A cataliza la fosforilación de la fosfofructocinasa-2 (sección 11.5C). La disminución resultante de concentración de fructosa 2,6-*bi*fosfato elimina este potente activador de fosfofructocinasa-1 y alivia la inhibición de la fructosa 1,6-*bi*fosfatasa, activando así la gluconeogénesis.

La concentración de sustrato también regula la gluconeogénesis. Los principales sustratos para la gluconeogénesis en los mamíferos son los aminoácidos (principalmente alanina) y el lactato. Los aminoácidos provienen de la descomposición de las proteínas musculares, y se convierten en compuestos intermedios del ciclo del ácido cítrico. Bajo ciertas condiciones metabólicas, el oxalacetato producido en el ciclo del ácido cítrico es desviado hacia la gluconeogénesis. La concentración de aminoácidos en la sangre no satura las enzimas gluconeogénicas, y entonces al aumentar la concentración de aminoácidos libres el resultado es una mayor conversión a glucosa. De igual modo, la concentración de lactato en la sangre es menor a la de saturación para la gluconeogénesis. El lactato destinado a la gluconeogénesis se produce en particular en los

RECUADRO 12.1 A veces la glucosa se convierte en sorbitol

La glucosa, sea de la gluconeogénesis, de la dieta o de la glucogenólisis, suele oxidarse o reincorporarse al glucógeno. Sin embargo, en los tejidos de mamíferos (incluyendo el cristalino del ojo, los testículos, el páncreas y el cerebro), algo de glucosa se convierte en fructosa, como se ve en la ruta de abajo. La aldosa reductasa cataliza la reducción de la glucosa por el NADPH para producir sorbitol, y la poliol deshidrogenasa cataliza la oxidación del sorbitol a fructosa por $NAD^{\oplus}$. Esta ruta corta suministra la fructosa esencial para algunas células. Por ejemplo, la fructosa es el principal combustible para las células de esperma.

La aldosa reductasa tiene un alto valor de K_m para la glucosa, por lo que el flujo por esta ruta normalmente es bajo y la glucosa suele metabolizarse por glicólisis. Cuando la concentración de la glucosa es mayor que la normal (por ejemplo, en individuos con diabetes), en los tejidos como el cristalino se producen mayores cantidades de sorbitol. Hay menos actividad de poliol deshidrogenasa que actividad de aldosa reductasa, y se puede acumular el sorbitol. Las membranas son relativamente impermeables al sorbitol. El cambio resultante de osmolaridad en las células causa el agregamiento y precipitación de proteínas del cristalino, lo que causa cataratas: regiones opacas en el cristalino.



músculos, lo que refleja la gran masa y la gran rapidez de la glicólisis en los músculos. De esta manera, las actividades metabólicas en otros tejidos pueden afectar la velocidad de gluconeogénesis en el hígado.

12.4 La ruta de las pentosas fosfato

La ruta de las pentosas fosfato es de síntesis de tres pentosas fosfato: ribulosa 5-fosfato, ribosa 5-fosfato y xilulosa 5-fosfato. Se requiere ribosa 5-fosfato en la síntesis del ARN y el ADN. La ruta completa tiene dos etapas: una oxidante y una no oxidante (figura 12.5). En la etapa oxidante se produce NADPH cuando se convierte la glucosa 6-fosfato en ribulosa 5-fosfato, compuesto de cinco carbonos.

$$\text{Glucosa 6-fosfato} + 2\,NADP^{\oplus} + H_2O \longrightarrow \text{Ribulosa 5-fosfato} + 2\,NADPH + CO_2 + 2\,H^{\oplus} \qquad \textbf{(12.8)}$$

Si se requieren cantidades importantes de NADPH y de nucleótidos al mismo tiempo, toda la ribulosa 5-fosfato se isomeriza a ribosa 5-fosfato, y se completa la ruta en esta etapa. En algunos casos se necesita más NADPH que ribosa 5-fosfato, y la mayor parte de las pentosas fosfato se convierten en intermedios de glicólisis.

La etapa no oxidante de la ruta de las pentosas fosfato usa la pentosa fosfato formada en la etapa oxidante al proporcionar una ruta hacia la glicólisis. En esta etapa, la ribulosa 5-fosfato se convierte en los compuestos intermedios de la glicólisis: fructosa 6-fosfato y gliceraldehído 3-fosfato. Si se convirtiera toda las pentosas fosfato en compuestos intermedios en la glicólisis, la suma de las reacciones no oxidantes sería la conversión de tres moléculas de pentosa en dos moléculas de hexosa más una molécula de triosa.

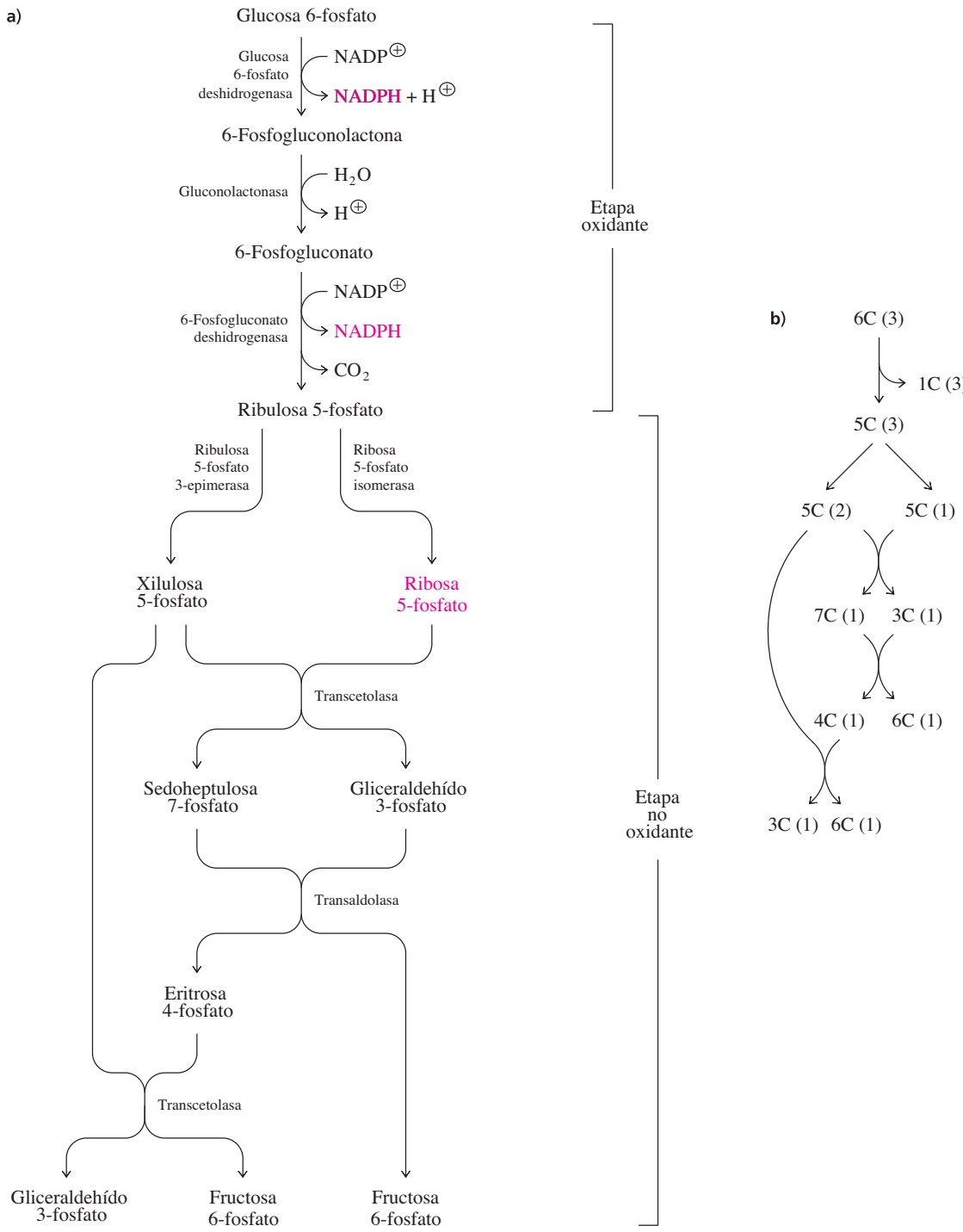


Figura 12.5 ▲
Ruta de las pentosas fosfato. **a)** La etapa oxidante de la ruta produce un azúcar fosfato de cinco carbonos, ribulosa 5-fosfato, con producción concomitante de NADPH. La etapa no oxidante produce los intermedios glicolíticos gliceraldehído 3-fosfato y fructosa 6-fosfato. **b)** Trayectoria del carbono en la ruta de las pentosas fosfato. En la etapa oxidante, se convierten tres moléculas de un compuesto con cinco carbonos en tres moléculas de un azúcar con cinco carbonos (ribulosa 5-fosfato) liberando tres moléculas de CO_2. En la etapa no oxidante, tres moléculas de azúcares con cinco carbonos se interconvierten para producir dos moléculas de un azúcar con seis carbonos (fructosa 6-fosfato) y una molécula de un compuesto con tres carbonos (gliceraldehído 3-fosfato).

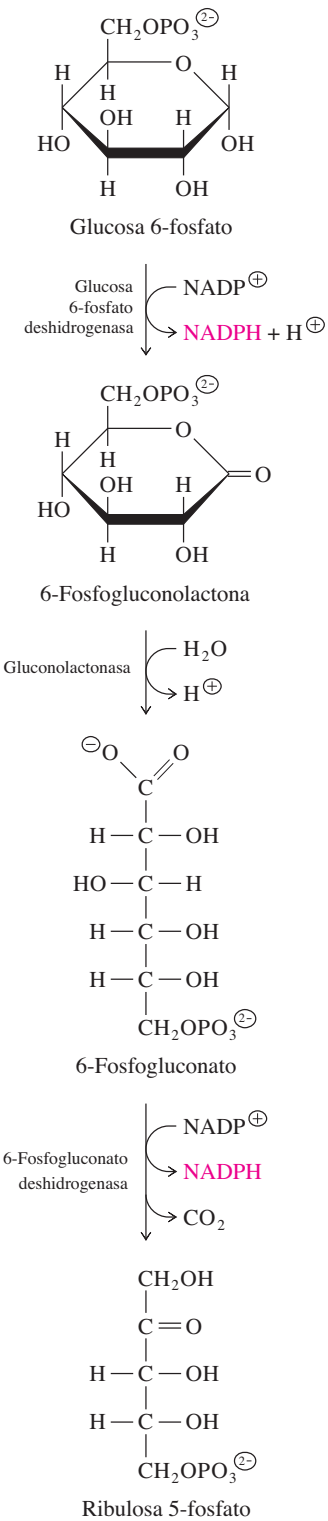


Figura 12.6 ▲
Etapa oxidante de la ruta de las pentosas fosfato. Se generan dos moléculas de NADPH por cada molécula de glucosa 6-fosfato que entra a la ruta.

3 Ribulosa 5-fosfato ⟶

2 Fructosa 6-fosfato + Gliceraldehído 3-fosfato **(12.9)**

Tanto la fructosa 6-fosfato como el gliceraldehído 3-fosfato se pueden metabolizar en la glicólisis o en la gluconeogénesis. Ahora se examinarán con más detalle las reacciones de la ruta de las pentosas fosfato.

A. Etapa oxidante

En la figura 12.6 se muestran las tres reacciones de la etapa oxidante de la ruta de las pentosas fosfato. Los dos primeros pasos son iguales a los de la ruta de Entner-Doudoroff bacteriana (sección 11.7). La primera reacción, catalizada por la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), es la oxidación de la glucosa 6-fosfato a 6-fosfogluconolactona. Este paso es el principal sitio de regulación en toda la ruta de las pentosas fosfato. La glucosa 6-fosfato deshidrogenasa es inhibida de manera alostérica por el NADPH. Esta simple propiedad reguladora asegura que sea autolimitante la producción de NADPH por la ruta de las pentosas fosfato.

La siguiente enzima de la fase oxidante es la gluconolactonasa, que cataliza la hidrólisis de la 6-fosfogluconolactona para formar el azúcar ácido 6-fosfogluconato. Por último, la 6-fosfogluconato deshidrogenasa cataliza la descarboxilación oxidante del 6-fosfogluconato. Esta reacción produce una segunda molécula de NADPH, ribulosa 5-fosfato y CO_2. Por consiguiente, en la etapa oxidante se oxida un azúcar de seis carbonos y se forma un azúcar de cinco carbonos más CO_2, y se sintetizan dos moléculas de NADPH.

B. Etapa no oxidante

La etapa no oxidante de la ruta de las pentosas fosfato consiste por completo en reacciones cercanas al equilibrio. Esta etapa de la ruta proporciona azúcares de cinco carbonos para la biosíntesis, e introduce fosfatos de azúcar a la glicólisis o a la gluconeogénesis. La ribulosa 5-fosfato tiene dos destinos: una epimerasa puede catalizar la formación de xilulosa 5-fosfato, o una isomerasa puede catalizar la formación de ribulosa 5-fosfato (figura 12.7). La ribulosa 5-fosfato es precursor de la fracción de ribosa (o desoxirribosa) de los nucleótidos. Los pasos restantes en la ruta convierten azúcares de cinco carbonos en compuestos glucolíticos intermedios. Las células en división rápida requieren tanto ribosa 5-fosfato (como precursor de residuos de ribonucleótido y desoxirribonucleótido) y NADPH (para la reducción de ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos). En general, estas células tienen gran actividad en la ruta de las pentosas fosfato.

La ruta total de las pentosas fosfato (figura 12.5) muestra que en la etapa oxidante se interconvierten dos moléculas de xilulosa 5-fosfato y una molécula de ribosa 5-fosfato para generar una molécula con tres carbonos (gliceraldehído 3-fosfato) y dos moléculas de seis carbonos (fructosa 6-fosfato). Así, los productos carbonados del paso de tres moléculas de glucosa por la ruta de las pentosas fosfato son gliceraldehído 3-fosfato, fructosa 6-fosfato y CO_2. La ecuación balanceada para este proceso es

$$3\ \text{Glucosa 6-fosfato} + 6\ \text{NADP}^{\oplus} + 3\ \text{H}_2\text{O} \longrightarrow 2\ \text{Fructosa 6-fosfato} + \text{Gliceraldehído 3-fosfato} + 6\ \text{NADPH} + 3\ \text{CO}_2 + 6\ \text{H}^{\oplus}. \quad \textbf{(12.10)}$$

En la mayor parte de las células, el gliceraldehído 3-fosfato y la fructosa 6-fosfato producidos en la ruta de las pentosas fosfato se usan para sintetizar glucosa 6-fosfato. En este caso, el equivalente de una molécula de glucosa se oxida por completo a CO_2 pasando seis veces por la ruta. Después de oxidarse seis moléculas de glucosa 6-fosfato, las seis ribulosas 5-fosfato producidos se pueden reacondicionar en las reacciones de la ruta de las pentosas fosfato, y parte de la ruta de la gluconeogénesis, para formar cin-

RECUADRO 12.2 Deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa en humanos

La genética de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa humana (G6DPH) ha sido tema de muchas investigaciones. Hay dos enzimas diferentes que pueden catalizar la reacción que se ve en la figura 12.6. Uno de los genes, G6PDH, está en el cromosoma X (Xq28) y se expresa casi exclusivamente en los glóbulos rojos. El otro gen, H6PDH, está en el cromosoma 1 (1p36.13). El segundo gen codifica una enzima que es menos específica; puede usar otros sustratos de hexosa. La hexosa 6-fosfato deshidrogenasa (H6PDH) se sintetiza en muchas células, donde sirve como la primera enzima en la etapa oxidante de la ruta de la pentosa fosfato.

En los glóbulos rojos, la reacción de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa es la única capaz de reducir $NADP^{\oplus}$. En consecuencia, las deficiencias de esta enzima tienen efectos notables sobre el metabolismo en esas células. Otras células no son afectadas, porque contienen H6PDH. La deficiencia de G6PDH en los humanos causa anemia hemolítica. Hay más de 130 alelos distintos en el gen G6PDH del cromosoma X. Las variantes producen menores cantidades de la enzima, o alteran su eficiencia catalítica. No se conocen mutantes nulos en la población humana, porque la ausencia completa de actividad G6PDH es letal (los varones sólo tienen una copia del gen en su cromosoma X, y las mujeres uno de los genes del cromosoma X no está activo).

Se estima que 400 millones de personas tienen alguna forma de deficiencia de G6PDH y padecen formas benignas de anemia hemolítica. Los síntomas pueden poner en riesgo la vida si el paciente recibe tratamiento con ciertos medicamentos que se suelen recetar para otras enfermedades. Muchos de esos individuos tienen mayor resistencia al paludismo, porque el parásito de la malaria no sobrevive bien en glóbulos rojos que producen menores cantidades de NADPH. Eso explica por qué hay tanta deficiencia de alelos que se segregan en la población humana, a pesar de que la ruta de las pentosas fosfato es ineficiente.

co moléculas de glucosa 6-fosfato. (Recuérdese que dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato son equivalentes a una molécula de fructosa 1.6-*bi*fosfato.) Sin considerar H_2O y $H^{\oplus}$, la reacción estequiométrica general para este proceso es

Las reacciones de la etapa no oxidante de la ruta de las pentosas fosfato se parecen a las de la etapa de regeneración del ciclo de Calvin (sección 15.4).

$$6 \text{ Glucosa 6-fosfato} + 12\ NADP^{\oplus} \longrightarrow 5 \text{ Glucosa 6-fosfato} + 12\ NADPH + 6\ CO_2 + P_i \qquad \textbf{(12.11)}$$

En esta reacción neta se subraya que la mayor parte de la glucosa 6-fosfato que entra a la ruta de las pentosas fosfato se puede reciclar; la sexta parte se convierte en CO_2 y P_i. En realidad, un nombre alterno de la ruta es *ciclo de las pentosas fosfato*.

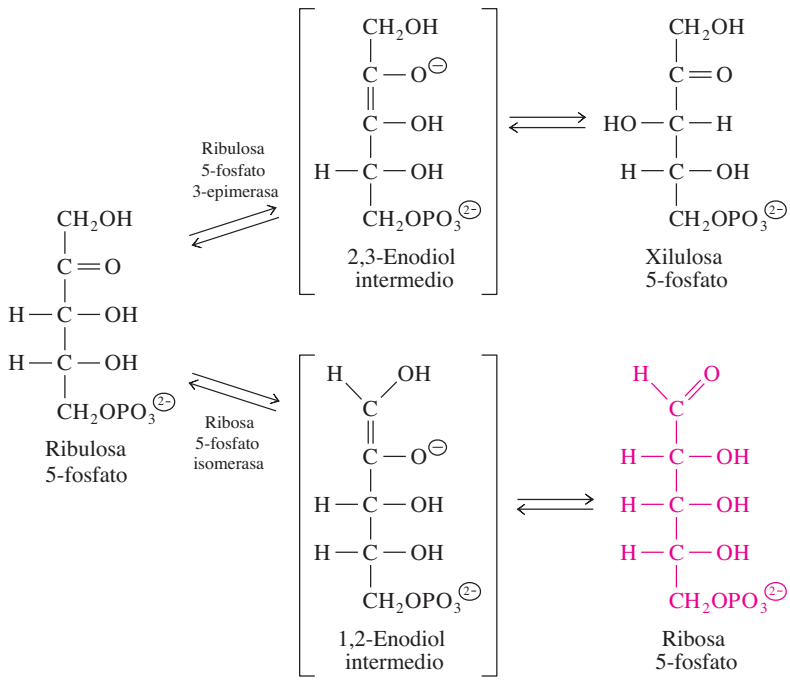


Figura 12.7
Conversión de ribulosa 5-fosfato a xilulosa 5-fosfato o ribosa 5-fosfato. En ambos casos, la eliminación de un protón forma un enodiol intermedio. La reprotonación forma la cetosa xilulosa 5-fosfato, o la aldosa ribosa 5-fosfato.

C. Interconversiones catalizadas por transcetolasa y transaldolasa

Las interconversiones en la etapa no oxidante de la ruta de las pentosas fosfato son catalizadas por dos enzimas, llamadas transcetolasa y transaldolasa. Esas enzimas tienen amplias especificidades hacia sustratos.

La transcetolasa también se llama glicoaldehídotransferasa. Es una enzima dependiente de tiamina pirofosfato (TPP, de *thiamine pyrophosphate*) que cataliza la transferencia de un grupo glicoaldehído, de una cetosa fosfato a una aldosa fosfato. La cetosa fosfato se acorta dos carbonos, y la aldosa fosfato se alarga dos carbonos. Hay dos reacciones de transcetolasa en la ruta de la pentosa fosfato. En la primera, se convierten dos azúcares de cinco carbonos en productos con tres y siete carbonos (figura 12.8). La segunda reacción de transcetolasa produce dos de los productos finales de la ruta (figura 12.5).

A la transaldolasa también se le llama dihidroxiacetonatransferasa. Cataliza la transferencia de un grupo dihidroxiacetona de tres carbonos, de una cetosa fosfato a una aldosa fosfato. La reacción de transaldolasa en la ruta de las pentosas fosfato convierte la sedoheptulosa 7-fosfato y el gliceraldehído 3-fosfato en eritrosa 4-fosfato y fructosa 6-fosfato (figura 12.9).

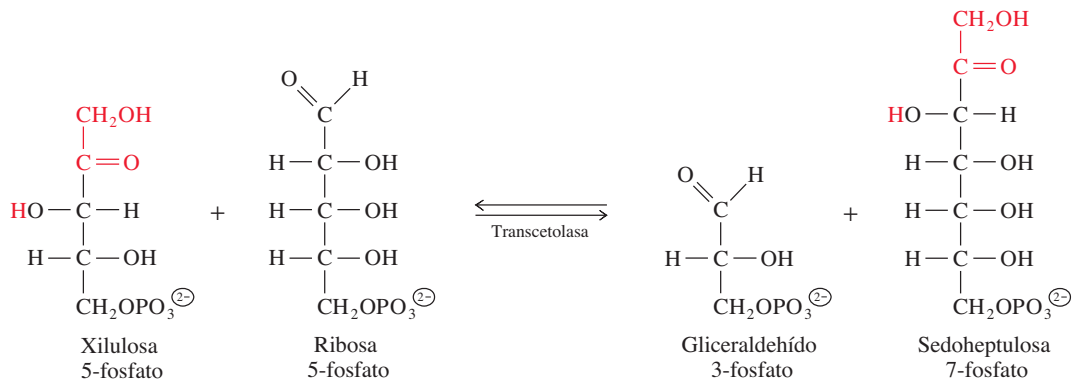


Figura 12.8 ▲
Reacción catalizada por la transcetolasa. La transferencia reversible de un grupo glicoaldehído (en gris) de la xilulosa 5-fosfato a ribosa 5-fosfato genera gliceraldehído 3-fosfato y sedoheptulosa 7-fosfato. Nótese que el sustrato de fosfato de cetosa (en cualquier dirección) se acorta en dos átomos de carbono, en tanto que el sustrato de aldosa fosfato se alarga en dos átomos de carbono. En este ejemplo, 5C + 5C ⟹ 3C + 7C.

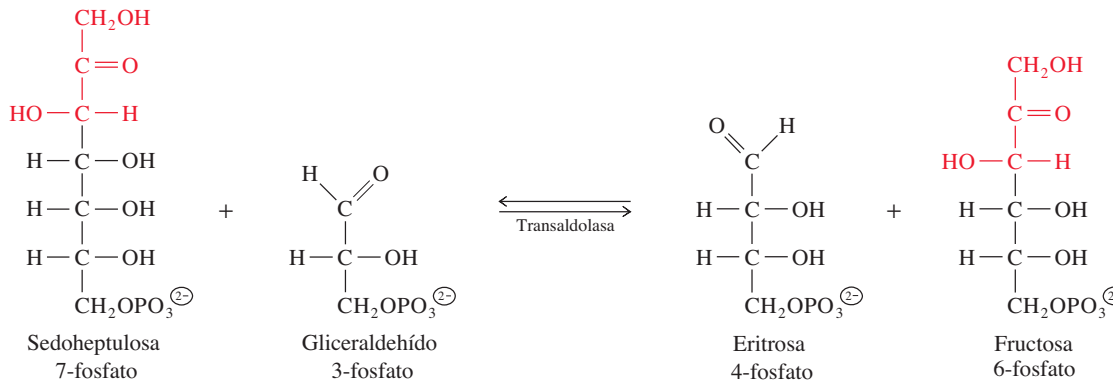
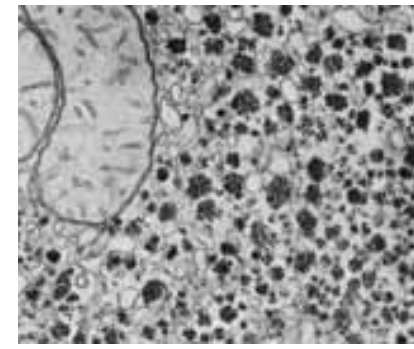


Figura 12.9 ▲
Reacción catalizada por la transaldolasa. La transferencia reversible de un grupo dihidroxiacetona, con tres carbonos (en gris) de sedoheptulosa 7-fosfato al C-1 del gliceraldehído 3-fosfato genera una nueva cetosa fosfato, la fructosa 6-fosfato; también libera una nueva aldosa fosfato, la eritrosa 4-fosfato. Nótese que los átomos de carbono están balanceados: 7C + 3C ⟹ 6C + 4C.

12.5 Metabolismo del glucógeno

La glucosa se almacena en forma de los polisacáridos almidón y glucógeno. En el capítulo 15 se describirá el metabolismo del almidón, que se efectúa principalmente en las plantas. El glucógeno es un importante polisacárido de almacenamiento en las bacterias, protistas, hongos y animales. La mayor parte del glucógeno en los vertebrados se encuentra en las células musculares y hepáticas. En las micrografías electrónicas, el glucógeno muscular aparece como granos citosólicos con un diámetro de 10 a 40 nm, más o menos del mismo tamaño que los ribosomas. Las partículas de glucógeno en las células hepáticas son unas tres veces mayores. Las enzimas necesarias para degradar el glucógeno también se encuentran en las células musculares y hepáticas.

La síntesis de glucógeno comienza con la glucosa 6-fosfato, que puede convertirse en glucosa 1-fosfato. En la sección 11.5 se vio que la glucosa 6-fosfato puede entrar a varias rutas, que incluyen las de glicólisis y las de pentosas fosfato. La síntesis y la degradación del glucógeno son principalmente una forma de almacenar glucosa 6-fosfato hasta que la célula la necesite. La síntesis y degradación de glucógeno requieren pasos enzimáticos separados. Ya se ha señalado que una regla general del metabolismo es que las rutas de biosíntesis y degradación tienen trayectorias distintas.

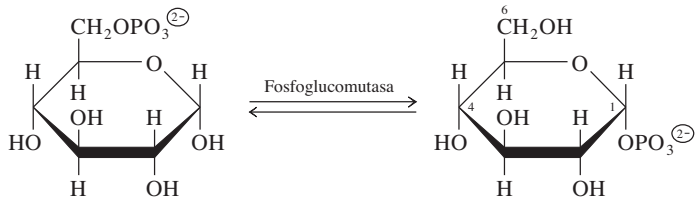


▲Partículas de glucógeno en un corte de célula hepática (micrografía electrónica).

A. Síntesis de glucógeno

Se requieren tres reacciones separadas, catalizadas por enzima, para incorporar una molécula de glucosa 6-fosfato al glucógeno (figura 12.10). Primero, la fosfoglucomutasa cataliza la conversión, cercana al equilibrio, de glucosa 6-fosfato en glucosa 1-fosfato. La glucosa 1-fosfato se activa entonces reaccionando con UTP y formando UDP-glucosa y pirofosfato (PP_i). En la tercera etapa, la glucógeno sintasa cataliza la adición de residuos de glucosa de la UDP-glucosa al extremo no reductor del glucógeno.

La fosfoglucomutasa es una enzima ubicua. Cataliza una reacción cercana al equilibrio, donde se convierte α-D-glucosa 6-fosfato en α-D-glucosa 1-fosfato.



(12.12)

El mecanismo de esta reacción es parecido al de la fosfoglicerato mutasa, dependiente de cofactor (sección 11.2, parte 8). La glucosa 6-fosfato se une a la fosfoenzima y la glucosa 1,6-*bi*fosfato se forma como intermedio enlazado a enzima. La transferencia del fosfato en C-6 a la enzima deja a la glucosa 1-fosfato.

En el segundo paso de la síntesis de glucógeno, la glucosa 1-fosfato se activa por formación de UDP-glucosa. En esta reacción, un grupo UMP del UTP se transfiere al fosfato que está en el C-1, con liberación de pirofosfato. La enzima que cataliza esta reacción se llama UDP glucosa pirofosforilasa, y existe en la mayor parte de las especies eucarióticas. Nótese que la activación de la glucosa sucede a expensas de un equivalente de ATP en forma de UTP. La energía se almacena en la UDP-glucosa, donde se puede usar en muchas reacciones de biosíntesis. En la sección 11.6 se vio que la UDP-glucosa puede ser un sustrato para la síntesis de la UDP-galactosa. La UDP-galactosa se usa en la síntesis de los gangliósidos. El cambio de energía libre de Gibbs en la reacción de la UDP glucosa fosforilasa es cercano a cero, porque uno de los productos (UDP-glucosa) es rico en energía. La reacción es impulsada en la dirección de síntesis de UDP-glucosa por la hidrólisis subsecuente del pirofosfato (sección 10.6).

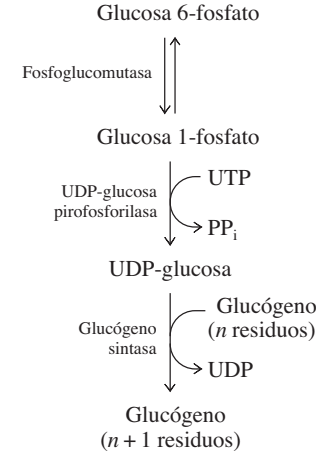


Figura 12.10 ▲
Síntesis del glucógeno en eucariotas.

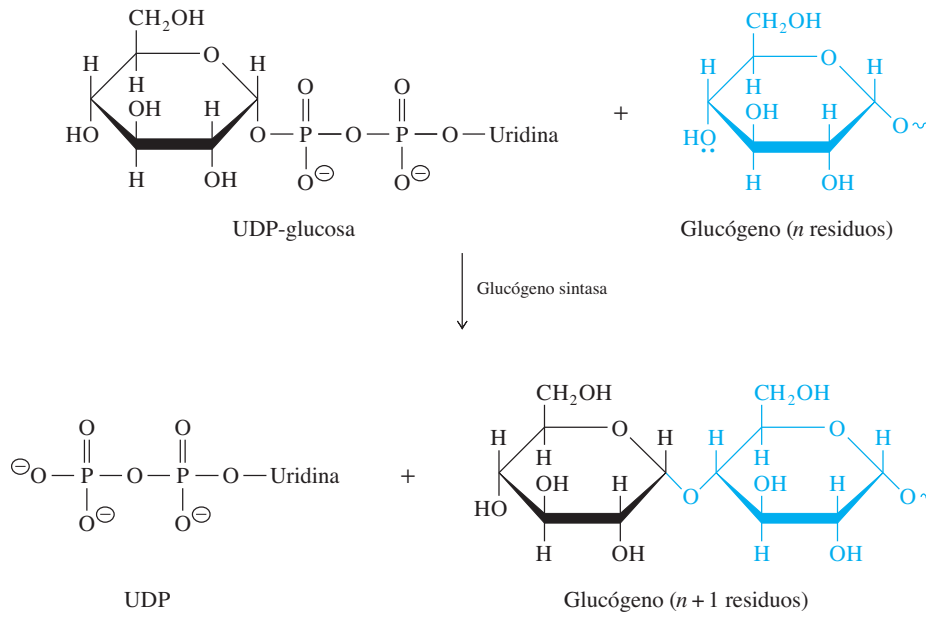


Figura 12.11 ▲
Adición de un residuo de glucosa al extremo no reductor de una molécula de glucógeno, catalizada por glucógeno sintasa.

La síntesis de glucógeno es una reacción de polimerización, donde se agregan unidades de glucosa, una por una, a una cadena de polisacárido creciente. Esta reacción es catalizada por la glucógeno sintasa (figura 12.11).

Las glucógeno sintasas que requieren UDP-glucosa están presentes en protistas, animales y hongos. Algunas bacterias sintetizan glucógeno usando ADP-glucosa. En las plantas, esa síntesis también requiere ADP-glucosa. La reacción de glucógeno sintasa es el principal paso regulador en la síntesis de glucógeno. En los animales hay hormonas que controlan la rapidez de síntesis de glucógeno, alterando la actividad de la glucógeno sintasa.

La glucógeno sintasa requiere un cebador preexistente de glucógeno, de uno a cuatro residuos de glucosa enlazados en α-(1 $\rightarrow$ 4). Este cebador está unido a un residuo específico de tirosina, de una proteína llamada glucogenina, a través del grupo 1-hidroxilo del extremo reductor en el polisacárido corto. El cebador se forma en dos pasos. El primer residuo de glucosa se une a la glucogenina por acción de una actividad de glucosiltransferasa que requiere UDP-glucosa como donante de grupo glucosilo. La misma glucogenina cataliza la extensión del cebador hasta en siete residuos más de glucosa. Así, la glucogenina es a la vez un andamio proteico para el glucógeno, y una enzima. Cada complejo de glucógeno contiene una sola molécula de glucogenina y cuando menos 50 000 residuos de glucosa. La glucógeno sintasa cataliza el alargamiento posterior del glucógeno, según se describió antes.

Otra enzima, la amilo-(1,4 $\rightarrow$ 1,6)-transglucosilasa, cataliza la formación de ramas en el glucógeno. Esta enzima se llama también enzima ramificadora, y elimina un oligosacárido de cuando menos seis residuos, del extremo no reductor de una cadena alargada, y lo fija mediante un enlace α-(1 $\rightarrow$ 6) a una posición que dista cuando menos cuatro residuos de glucosa del punto más cercano de ramificación α-(1 $\rightarrow$ 6). Estas ramas forman muchos sitios para adicionar o eliminar residuos de glucosa, y así contribuyen a la rapidez con que se puede sintetizar o degradar el glucógeno.

B. Degradación del glucógeno

Los residuos de glucosa en el almidón y el glucógeno son liberados de sus polímeros de almacenamiento, o son movilizados por acción de enzimas llamadas polisacárido fosfo-

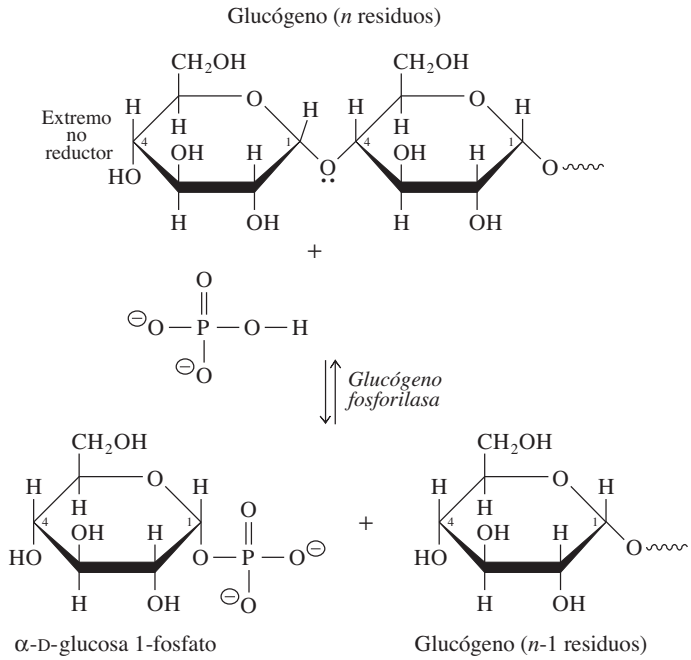
rilasas: almidón fosforilasa (en las plantas) y glucógeno fosforilasa (en muchos otros organismos). Estas enzimas catalizan la eliminación de residuos de glucosa de los extremos no reductores del almidón o del glucógeno, siempre que los monómeros estén unidos por enlaces α-(1 $\rightarrow$ 4). Como lo indica su nombre, las enzimas catalizan una reacción de fosforólisis donde la ruptura de un enlace se acopla a la transferencia de grupo a un átomo de oxígeno de fosfato. En contraste con la hidrólisis (transferencia de grupo al agua), la fosforólisis produce ésteres de fosfato. Entonces, el primer producto de la descomposición del polisacárido es α-D-glucosa 1-fosfato, y no glucosa libre.

$$\underset{(n \text{ residuos})}{\text{Polisacárido}} + P_i \xrightarrow{\substack{\text{Polisacárido} \\ \text{fosforilasa}}} \underset{(n - 1 \text{ residuos})}{\text{Polisacárido}} + \text{Glucosa 1-fosfato} \qquad \textbf{(12.13)}$$

La reacción de fosforólisis catalizada por la glucógeno fosforilasa se muestra en la figura 12.12. El fosfato de piridoxal (PLP) es un grupo prostético en el sitio activo de la enzima. El grupo fosfato del PLP parece mandar un protón al fosfato sustrato, para ayudar a romper el enlace C—O escindible del glucógeno.

La glucógeno fosforilasa es un dímero de subunidades idénticas bilobuladas (figura 12.13 de la página siguiente). Cada subunidad tiene un peso molecular de 97 000. Los sitios catalíticos están en las hendiduras entre los dos dominios de cada subunidad, en los extremos opuestos a la interfase de la subunidad. Cada subunidad tiene una región que se une a una partícula de glucógeno. Los inhibidores alostéricos ATP y glucosa 6-fosfato, y el activador alostérico AMP se unen cerca de la interfase entre las subunidades. La glucógeno fosforilasa es una enzima interconvertible: la forma totalmente activa, fosforilada, se llama fosforilasa *a*, y la forma desfosforilada, menos activa, se llama fosforilasa *b*.

La glucógeno fosforilasa cataliza la eliminación sucesiva de residuos de glucosa, en los extremos no reductores de las cadenas de glucógeno. La enzima se detiene a cuatro residuos de glucosa de un punto de ramificación [un enlace glucosídico α-(1 $\rightarrow$ 6)] y deja una dextrina límite. La dextrina límite se puede seguir degradando por acción de la enzima bifuncional desramificadora de glucógeno (figura 12.14, página 375). Una actividad de glucanotransferasa en la enzima desramificadora cataliza la reubicación de una cadena de tres residuos de glucosa, desde una rama hasta un extremo libre con hidroxilo 4,



◀ Figura 12.12
Escisión de un residuo de glucosa del extremo no reductor de una cadena de glucógeno, catalizada por glucógeno fosforilasa. Un fosfato inorgánico en el sitio activo cede un protón al átomo de oxígeno del enlace α-glucosídico terminal del glucógeno. El átomo de oxígeno desprotonado ataca entonces al C-1 para producir glucosa 1-fosfato y una molécula de glucógeno acortada en un residuo de glucosa.

Figura 12.13 ▶
Sitios de enlace y catálisis en la glucógeno fosforilasa.

de la molécula de glucógeno. Tanto el enlace original como el nuevo son α-(1 $\rightarrow$ 4). La otra actividad de la enzima desramificadora de glucógeno, la amilo-1,6-glucosidasa, cataliza la eliminación hidrolítica (no fosforolítica) del residuo restante de glucosa con enlace α-(1 $\rightarrow$ 6). Los productos son una molécula de glucosa libre y una cadena alargada que de nuevo es un sustrato para la glucógeno fosforilasa. Cuando una molécula de glucosa liberada del nitrógeno por acción de la enzima desramificadora entra a la glicólisis, se producen dos moléculas de ATP (sección 11.1). En contraste, cada molécula de glucosa movilizada por acción de la glucógeno fosforilasa (que representa aproximadamente 90% de los residuos en el glucógeno) produce tres moléculas de ATP. El rendimiento energético del glucógeno es mayor que el de la glucosa libre, porque la glucógeno fosforilasa cataliza la fosforólisis y no la hidrólisis: no se consume ATP como en la fosforilación de la glucosa libre, catalizada por hexocinasa.

El producto de la degradación del glucógeno es glucosa 1-fosfato, y se convierte rápidamente en glucosa 6-fosfato por la fosfoglucomutasa.

12.6 Regulación del metabolismo del glucógeno

El glucógeno en los mamíferos almacena glucosa en tiempos de abundancia (después del alimento, mientras hay altas concentraciones de glucosa) y suministra glucosa cuando es necesario (durante el ayuno o en casos de "pelear o huir"). En los músculos, el glucógeno proporciona combustible para la contracción muscular. En contraste, el glucógeno en el hígado se convierte principalmente en glucosa que sale de las células hepáticas y entra al torrente sanguíneo para su transporte a otros tejidos donde se requiera. Tanto la movilización como la síntesis de glucógeno están reguladas por hormonas.

Según se mencionó en la sección 12.5B, la glucógeno fosforilasa se inhibe de manera alostérica por ATP y glucosa 6-fosfato, y se activa por AMP. Algunos músculos pueden movilizar glucógeno como respuesta a mayores concentraciones de AMP. Sin embargo, en la mayor parte de los casos la actividad de la glucógeno fosforilasa es regulada en particular por modificación covalente (fosforilación). La actividad de la glucógeno sintasa también se controla con glucosa 6-fosfato y fosforilación, pero en forma recíproca, por lo que se inhibe la síntesis de glucógeno cuando hay movilización, y viceversa.

A. Regulación del metabolismo de glucógeno por las hormonas

Las principales hormonas que controlan el metabolismo del glucógeno en los mamíferos son la insulina, el glucagón y la epinefrina. La insulina es una proteína con 51 residuos, sintetizada por las células del páncreas, y se secreta cuando aumenta la concentración de la glucosa en la sangre. Así, las altas concentraciones de insulina se asocian al estado saciado de un animal. La insulina aumenta la tasa de transporte de glucosa a los músculos y tejido adiposo, por la ruta del transportador de glucosa GLUT4 (sección 11.5A). La insulina también estimula la síntesis de glucógeno en el hígado, al parecer causando la desfosforilación de un sitio específico en la glucógeno sintasa. Aunque la ruta de señalización para este efecto todavía no se conoce, incluye la estimulación de una cascada de proteína cinasa por el segundo mensajero fosfatidilinositol 3,4,5-*tris*fosfato (PIP_3) (sección 9.12D).

El glucagón es una hormona que contiene 29 residuos de aminoácido y la segregan células α del páncreas como respuesta a baja concentración de glucosa en la sangre. El glucagón restaura la concentración de glucosa hemática a un valor continuo, estimulando la degradación del glucógeno. Sólo las células hepáticas son ricas en receptores de glucagón, por lo que el glucagón es en extremo selectivo de su objetivo. El efecto del glucagón es contrario al de la insulina, y una concentración elevada de glucagón se asocia al ayuno.

Las glándulas suprarrenales liberan la catecolamina epinefrina (llamada también adrenalina) (figura 3.5c) y, en menor grado, su precursora norepinefrina (que también tiene actividad hormonal), como respuesta a señales neurales que disparan la respuesta de pelear o huir. La epinefrina estimula la descomposición de glucógeno en glucosa 1-fosfato que se convierte en glucosa 6-fosfato. El aumento de la glucosa 6-fosfato intracelular aumenta tanto la rapidez de glicólisis en los músculos, como la cantidad de glucosa liberada al torrente sanguíneo por el hígado. Nótese que la epinefrina dispara una respuesta a una necesidad repentina de energía, en tanto que el glucagón y la insulina actúan durante mayores periodos para mantener una concentración relativamente constante de glucosa en la sangre.

La epinefrina se une a receptores β-adrenérgicos en las células musculares y hepáticas, y a receptores α_1-adrenérgicos de las células hepáticas. La unión de epinefrina a receptores β-adrenérgicos o de glucagón a sus receptores activa la ruta de señalización de adenilil ciclasa. El segundo mensajero, el AMP cíclico (cAMP), activa entonces a la proteína cinasa A (figura 12.5a, página siguiente). El enlazamiento de la epinefrina a receptores α_1-adrenérgicos activa la ruta de señalización de inositol-fosfolípido, que causa la activación de la proteína cinasa C (figura 12.15b). Los receptores de insulina son objetivos de la proteína cinasa C. Los receptores fosforilados se unen mal a la insulina. Así, la acción de la proteína cinasa C, activada por la epinefrina, disminuye el efecto de la insulina.

B. Regulación recíproca de glucógeno fosforilasa y glucógeno sintasa

La glucógeno fosforilasa y la glucógeno sintasa controlan el metabolismo del glucógeno, tanto en las células hepáticas como en las musculares. Estas enzimas son reguladas en forma recíproca: cuando una está activa, la otra es inactiva. La regulación de las enzimas interconvertibles se efectúa por fosforilación y desfosforilación, catalizadas por proteína cinasas y proteína fosfatasas. La glucógeno fosforilasa es más activa en el estado fosforilado; la glucógeno sintasa es más activa en el estado desfosforilado.

	Forma activa (*a*)	Forma activa (*b*)
Glucógeno sintasa	—OH	—Ⓟ
Glucógeno fosforilasa	—Ⓟ	—OH

(12.14)

Las formas activa e inactiva de estas enzimas se denominan *a* y *b,* respectivamente.

La transducción de las señales hormonales por las rutas de adenilil ciclasa e inositol-fosfolípido se describió en la sección 9.12.

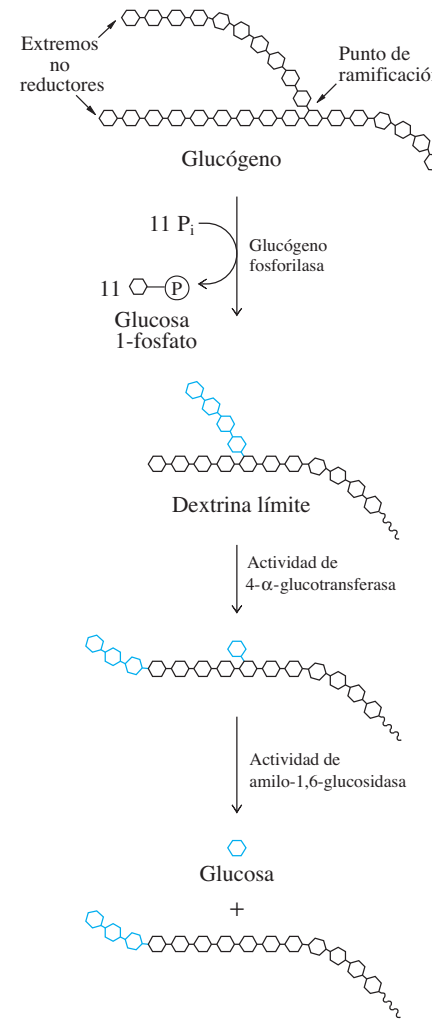


Figura 12.14 ▲
Degradación del glucógeno. La glucógeno fosforilasa cataliza la fosforólisis de las cadenas de glucógeno, deteniéndose a cuatro residuos de un punto de ramificación α-(1 → 6), y produciendo una molécula de glucosa 1-fosfato por cada residuo de glucosa movilizado. Se obtiene más degradación por las dos actividades de la enzima desramificadora de glucógeno. La actividad de la 4-α-glucotransferasa cataliza la transferencia de un trímero, de una rama de la dextrina límite a un extremo libre de la molécula de glucógeno. La actividad de la amilo-1,6-glucosidasa cataliza la liberación hidrolítica del residuo restante de glucosa enlazada en α-(1 → 6).

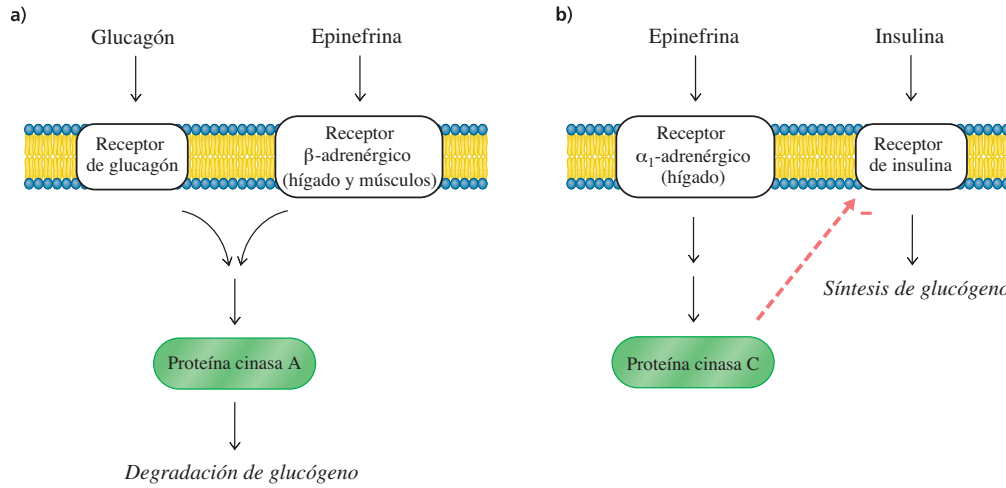


Figura 12.15 ▲
Efectos de las hormonas sobre el metabolismo del glucógeno. **a)** El enlazamiento del glucagón con sus receptores, o el enlazamiento de la epinefrina con receptores β-adrenérgicos estimula la degradación del glucógeno por la vía de proteína cinasa A. **b)** El enlazamiento de epinefrina a receptores adrenérgicos α_1 estimula la proteína cinasa C, que inactiva a los receptores de insulina. Las enzimas activadas son la proteína cinasa A y la proteína cinasa C.

La regulación alostérica de estas dos enzimas también es recíproca. Aunque la glucógeno fosforilasa se inhibe con la glucosa 6-fosfato, la forma desfosforilada de la glucógeno sintasa se activa con la glucosa 6-fosfato.

C. Acción de enzimas interconvertibles sobre la regulación intracelular del metabolismo del glucógeno

Se examinarán con más detalle los efectos de las tres hormonas sobre el metabolismo del glucógeno. Cuando la concentración de glucosa hemática es baja, la epinefrina y el glucagón disparan la actividad de la proteína cinasa A. La cinasa cataliza tanto la fosforilación como la activación de la fosforilasa cinasa, y la fosforilación y desactivación de la glucógeno sintasa (figura 12.16). La fosforilasa cinasa, a su vez, cataliza la fosforilación y activación de la glucógeno fosforilasa. Así es como el glucagón y la epinefrina aumentan al mismo tiempo la glucogenólisis y suprimen la síntesis de glucógeno.

La fosforilasa cinasa es una enzima grande formada por múltiples copias de cuatro subunidades distintas. Dos de las subunidades más grandes contienen residuos de serina que se fosforilan por acción de la proteína cinasa A. Otra subunidad contiene el sitio activo. La fosforilasa cinasa también está regulada en forma alostérica. El modulador más importante es Ca^{2+}, que se libera al citosol por impulsos nerviosos durante la contracción muscular. La subunidad más pequeña de la fosforilasa cinasa es una proteína reguladora que une calcio, llamada calmodulina, que cambia de conformación cuando une Ca^{2+}. El calcio activa sólo parcialmente a la fosforilasa cinasa; la enzima está totalmente activa cuando también se fosforila.

Los efectos de la epinefrina y el glucagón, que inducen al segundo mensajero cAMP, están limitados por una cAMP fosfodiesterasa. Esta enzima cataliza la hidrólisis rápida de cAMP a AMP, que no tiene actividad de segundo mensajero. Después de que baja la concentración de cAMP, las acciones de las proteína fosfatasas restauran las formas desfosforiladas de la fosforilasa cinasa, glucógeno fosforilasa y glucógeno sintasa. La proteína fosfatasa-1 cataliza la mayor parte de esta desfosforilación (figura 12.17). Esta enzima es una de una familia de proteína fosfatasas que actúan sobre proteínas fosforiladas de residuos de serina o treonina. Se activa con la fosforilación disparada por insulina.

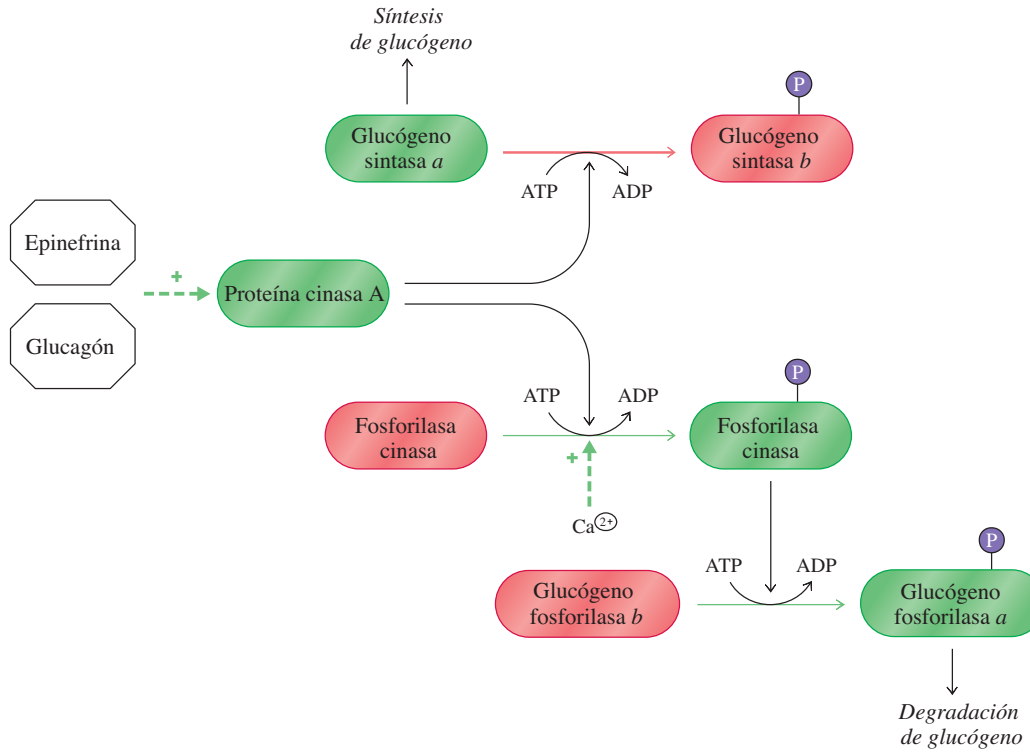


Figura 12.16 ▲
Activación de glucógeno fosforilasa y desactivación de glucógeno sintasa. Las reacciones de fosforilación catalizadas por la proteína cinasa A aumentan la degradación de glucógeno. Un fondo gris claro indica a las enzimas activadas; un fondo gris oscuro indica a las enzimas desactivadas. Las flechas grises representan activación, y las flechas gruesas significan desactivación.

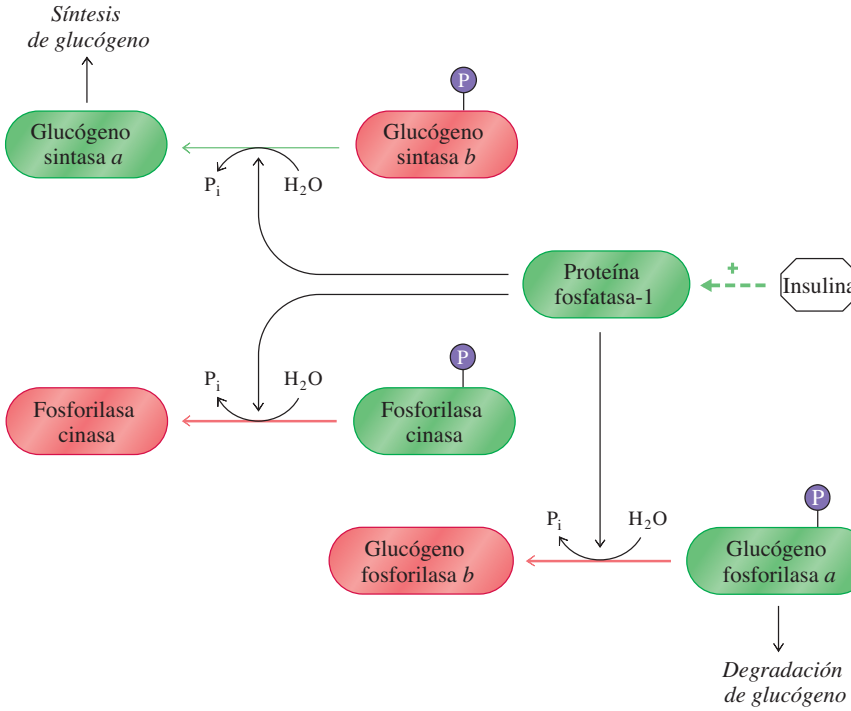


Figura 12.17 ▲
Activación de glucógeno sintasa y desactivación de glucógeno fosforilasa. La hidrólisis de los enlaces de monoéster de fosfato catalizada por la proteína fosfatasa-1 aumenta la síntesis del glucógeno.

En el hígado, la glucógeno fosforilasa *a* se une fuertemente a la proteína fosfatasa-1 y la inhibe. Como hay mucho más fosforilasa que fosfatasa en una célula hepática, la inhibición puede completarse virtualmente, y no puede haber síntesis de glucógeno (es decir, la glucógeno sintasa *b* no se desfosforila para pasar a su forma activa *a*). La glucosa alivia la inhibición de la proteína fosfatasa-1. La glucosa se enlaza a la glucógeno fosforilasa *a*, induciendo un cambio de conformación que permite que se active la proteína fosfatasa-1 que está enlazada. Entonces, la proteína fosfatasa-1 cataliza la desfosforilación (inactivación) de la molécula de glucógeno fosforilasa con la que está enlazada, y se libera (figura 12.18). La proteína fosfatasa-1 liberada puede desfosforilar (activar) entonces a la glucógeno sintasa. Esta relación reguladora asegura que la glucógeno sintasa no pueda ser activada por la proteína fosfatasa-1, sino hasta que se convierta casi

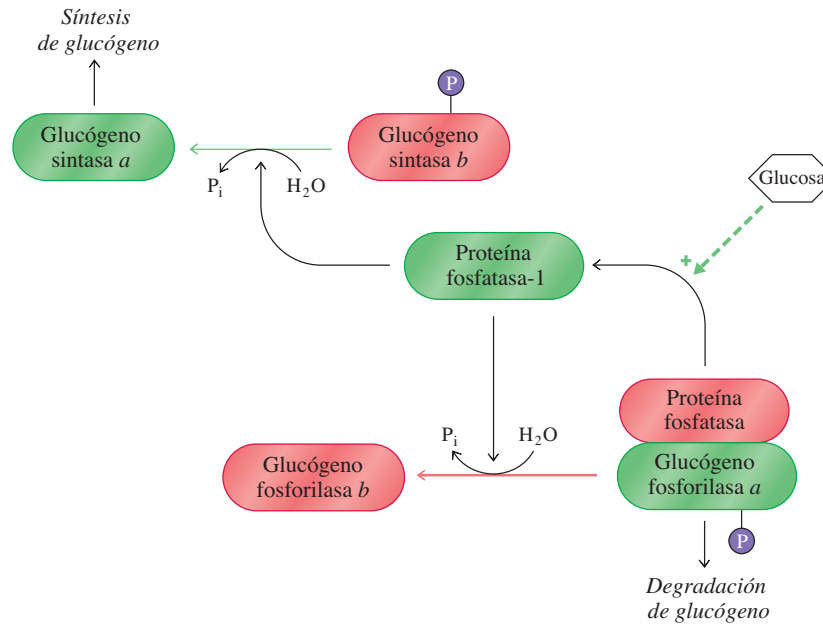


Figura 12.18 ▶
Regulación del metabolismo de glucógeno por la glucosa en el hígado. La inhibición de la proteína fosfatasa-1 por la glucógeno fosforilasa *a* se mitiga cuando la glucosa se une a la fosforilasa. A continuación se desactiva la glucógeno fosforilasa y se activa la glucógeno sintasa.

Recuadro 12.3 Enfermedades por almacenamiento de glucógeno

Diversas enfermedades metabólicas se relacionan con el almacenamiento de glucógeno. La más común, denominada enfermedad de von Gierke o enfermedad por almacenamiento de glucógeno tipo I (GSD-1), se debe a deficiencia de la glucosa 6-fosfatasa (GSD-1a) o al transporte de glucosa 6 fosfato (GSD-1b). Los genes para estas enzimas se hallan en el cromosoma 11 (11q23) y el cromosoma 17 (17q21), respectivamente. Existen alrededor de 70 diferentes alelos de cada tipo (es decir, cerca de 140 diferentes mutaciones pueden causar la enfermedad de Gierke).

En individuos afectados, la concentración de glucógeno en la sangre es baja, y éste se acumula en el hígado y los riñones debido a que la glucosa no se elimina en forma normal. La acumulación de glucosa 6-fosfato inhibe a la glucógeno fosforilasa y activa a la glucógeno cintasa. El alivio se logra al tomar pequeñas comidas que contengan carbohidratos que se hidrolicen lentamente. La ingestión excesiva de carbohidratos, que se almacenan en el hígado, puede ocasionar un gran aumento de volumen del hígado.

Las deficiencias de otras enzimas implicadas en el metabolismo del glucógeno causan trastornos metabólicos de diferente gravedad. Por ejemplo, en la enfermedad de Cori (tipo III de la enfermedad por almacenamiento de glucógeno) hay deficiencia de la enzima desramificadora. Sólo se movilizan los residuos de glucosa de las ramas externas del glucógeno. Las manifestaciones de esta enfermedad se parecen a las de la enfermedad de von Gierke, pero más ligeras. La enfermedad de McArdle (tipo V de la enfermedad por almacenamiento de glucógeno) se debe a una deficiencia de glucógeno fosforilasa del músculo. Los individuos con esta enfermedad genética no pueden efectuar ejercicios extenuantes y padecen calambres musculares dolorosos. La enfermedad de Hers (tipo VI) es una forma leve de la enfermedad por almacenamiento de glucógeno debida a deficiencia de fosforilasa hepática. El tipo VIII de la enfermedad es causado por baja actividad de la fosforilasa cinasa.

toda la glucógeno fosforilasa en su forma inactiva de fosforilasa *b*. Además, la acción de una proteína cinasa, estimulada por la insulina, causa la fosforilación e inactivación de una cinasa responsable de la fosforilación de la glucógeno sintasa. La menor fosforilación de la sintasa causa su activación. Justo como la concentración de glucosa en la sangre media la liberación inicial de insulina o glucagón, la concentración de glucosa intracelular (y su metabolito directo, glucosa 6-fosfato) regula al metabolismo del glucógeno en las células hepáticas. Cuando la concentración de glucosa es alta, se suprime la descomposición del glucógeno y aumenta su síntesis.

En los músculos y en algunos otros tejidos se inhibe la proteína fosfatasa-1 por una proteína pequeña llamada inhibidor-1. Cuando se fosforila el inhibidor-1 por acción de la proteína cinasa A, se transforma en un inhibidor alostérico potente de la proteína fosfatasa-1. Las enzimas interconvertibles que se pudieran desfosforilar por acción de la proteína fosfatasa-1 (fosforilasa cinasa, glucógeno fosforilasa y glucógeno sintasa) se quedan en sus estados fosforilados durante mucho más tiempo, cuando está activo el inhibidor-1.

12.7 Conservación de niveles de glucosa en los mamíferos

Los mamíferos conservan las concentraciones de glucosa en la sangre dentro de límites estrictos, regulando tanto la síntesis como la degradación de la glucosa. La glucosa es el principal combustible metabólico en el organismo. Algunos tejidos, como el cerebral, usan casi por completo glucosa para satisfacer sus necesidades de energía. La concentración de glucosa en la sangre casi nunca baja de 3 mM, ni sube de 10 mM. Cuando la concentración de la glucosa en la sangre baja de 2.5 mM, se pone en peligro la absorción de glucosa en el cerebro, y las consecuencias son graves. Al revés, cuando las concentraciones de glucosa en la sangre son muy altas, la glucosa se filtra y sale de la sangre, por los riñones, acompañada por pérdida osmótica de agua y electrolitos.

La diabetes, enfermedad del metabolismo de carbohidratos y lípidos, se describe en la sección 16.4 (recuadro 16.2).

El hígado tiene una función única en el metabolismo de la energía al participar en las interconversiones de toda clase de combustibles metabólicos: carbohidratos, aminoácidos y ácidos grasos. Desde el punto de vista anatómico, el hígado tiene lugar central en el sistema circulatorio (figura 12.19, página siguiente). La mayor parte de los tejidos están irrigados en paralelo, y el sistema arterial suministra sangre oxigenada y la circulación venosa regresa la sangre a los pulmones para su oxigenación. Sin embargo, el hígado está irrigado en serie con los tejidos viscerales (tracto gastrointestinal, páncreas, bazo y tejido adiposo); la sangre de esos tejidos drena a la vena porta, y pasa entonces al hígado. Eso quiere decir que después de que los productos de la digestión se absorben en el intestino, pasan de inmediato al hígado. Al usar su complemento especializado de enzimas, el hígado regula la distribución de los combustibles en la dieta, y suministra combustible de sus propias reservas cuando se agotan las reservas nutritivas.

El consumo de glucosa por los tejidos elimina a la glucosa de la dieta que hay en la sangre. Cuando bajan las concentraciones de glucosa, el glucógeno hepático y la gluconeogénesis se transforman en fuentes de glucosa. Sin embargo, como esas fuentes son limitadas, las hormonas actúan restringiendo el uso de la glucosa a las células y tejidos que dependan absolutamente de la glicólisis para generar ATP (riñón, médula, retina, glóbulos rojos y partes del cerebro). Otros tejidos pueden generar ATP oxidando los ácidos grasos movilizados desde el tejido adiposo (secciones 16.1C y 16.2).

La complejidad del metabolismo de los carbohidratos en los mamíferos es evidente por los cambios que suceden en la alimentación e inanición. En la década de 1960, George Cahill examinó el uso de glucosa por pacientes obesos cuando se les sometió a inanición terapéutica. Después de una alimentación inicial de glucosa, los sujetos sólo recibieron agua, vitaminas y minerales. Cahill notó que la homeostasia de glucosa (mantenimiento de concentraciones constantes en la circulación) pasa por cinco fases. La figura 12.20 se basa en las observaciones de Cahill y resume los cambios metabólicos en las cinco fases.

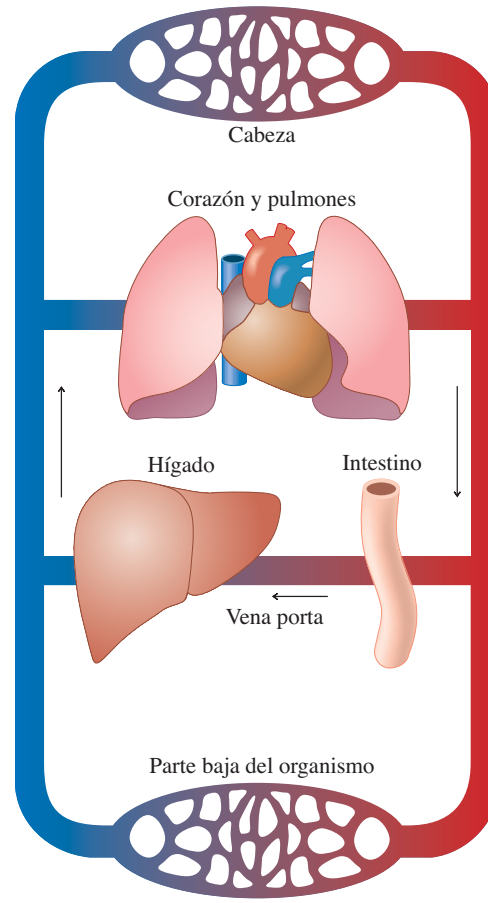


Figura 12.19 ▶
Posición del hígado en la circulación. La mayor parte de los tejidos están irrigados en paralelo. Sin embargo, el hígado está irrigado en serie con los tejidos viscerales. La sangre que drena del intestino y otros tejidos viscerales pasa al hígado por la vena porta. En consecuencia, la posición del hígado es ideal para regular el paso de combustibles a otros tejidos.

1. Durante la fase inicial de absorción (las primeras 4 h), la glucosa de la dieta entra al hígado por la vena porta, y la mayor parte de los tejidos usa glucosa como combustible primario. Bajo estas condiciones, el páncreas secreta insulina, que estimula la absorción de glucosa por los tejidos muscular y adiposo por vía del GLUT4. La glucosa absorbida por estos tejidos se fosforila a glucosa 6-fosfato, que no puede difundirse hacia afuera de las células. El hígado también absorbe

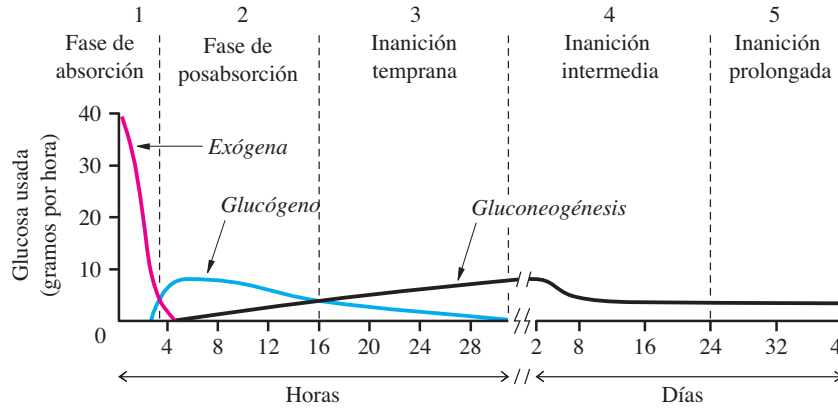


Figura 12.20 ▲
Cinco fases de la homeostasia de la glucosa. La gráfica, basada en las observaciones de varios individuos, ilustra la utilización de la glucosa en un varón de 70 kg que consumió 100 g de glucosa y después ayunó durante 40 días.

glucosa y la convierte en glucosa 6-fosfato. El exceso de glucosa se almacena como glucógeno en las células hepáticas y musculares.

2. Cuando se consume la glucosa de la dieta, el organismo moviliza el glucógeno del hígado para mantener las concentraciones de glucosa. En el hígado, la glucosa 6-fosfatasa cataliza la hidrólisis de glucosa 6-fosfato a glucosa, y la glucosa es exportada a través de la ruta de secreción (sección 12.20). El glucógeno muscular (donde no hay glucosa 6-fosfatasa) es metabolizado a lactato, para producir ATP para la contracción, y el lactato es consumido por otros tejidos como combustible, o por el hígado para la gluconeogénesis.
3. Después de unas 24 horas se agota el glucógeno en el hígado y la única fuente de glucosa circulante es la gluconeogénesis en el hígado usando lactato, glicerol y alanina como precursores. Los ácidos grasos movilizados desde el tejido adiposo se convierten en combustible alterno para la mayor parte de los tejidos. Los tejidos glucolíticos obligatorios continúan usando glucosa y produciendo lactato, que se convierte en glucosa en el hígado por el ciclo de Cori; este ciclo pone a disposición de otros tejidos la energía de la oxidación de ácidos grasos.
4. La gluconeogénesis en el hígado continúa a una tasa alta durante unos cuantos días y después disminuye. Al progresar la inanición, la gluconeogénesis en los riñones cobra una importancia proporcionalmente mayor. Las proteínas en los tejidos periféricos se descomponen para suministrar precursores gluconeogénicos. En esta fase el organismo se adapta a otros combustibles alternos.
5. En la inanición prolongada hay menos gluconeogénesis y se agotan las reservas de lípidos. Si no hay alimentación ocurrirá la muerte. Si hay alimentación, se restaura el metabolismo con rapidez a las condiciones del estado saciado.

Así, la glucosa, combustible principal, se puede almacenar en forma de un polisacárido y metabolizar cuando se necesite. También la glucosa se puede sintetizar a partir de precursores no carbohidratos, por las reacciones de la gluconeogénesis. Se ha visto que se puede oxidar la glucosa por la ruta de las pentosas fosfato para producir NADPH, o transformarse por glicólisis en piruvato. En el siguiente capítulo se describe el ciclo del ácido cítrico.

Resumen

1. La gluconeogénesis es la ruta de síntesis de glucosa a partir de precursores no carbohidratos. Las siete reacciones cercanas al equilibrio de la glicólisis se efectúan en dirección contraria en la gluconeogénesis. Cuatro enzimas específicas de la gluconeogénesis catalizan reacciones que se saltan las tres reacciones metabólicamente irreversibles de la glicólisis.
2. Los precursores no carbohidratos de la glucosa incluyen: piruvato, lactato, alanina y glicerol.
3. La gluconeogénesis está regulada por el glucagón, moduladores alostéricos y las concentraciones de sus sustratos.
4. La ruta de las pentosas fosfato moviliza a la glucosa 6-fosfato para generar NADPH y ribosa 5-fosfato. La etapa oxidante de la ruta genera dos moléculas de NADPH por molécula de glucosa 6-fosfato convertida en ribulosa 5-fosfato y CO_2. La etapa no oxidante comprende la isomerización de la ribulosa 5-fosfato a ribosa 5-fosfato. El metabolismo posterior de las moléculas de pentosa fosfato las puede convertir en compuestos glicolíticos intermedios. Las actividades combinadas de transcetolasa y transaldolasa convierten las pentosas fosfato en triosas fosfato y hexosas fosfato.
5. La síntesis de glucógeno es catalizada por la glucógeno sintasa, usando un cebador de glucógeno y UDP-glucosa.
6. Los residuos de glucosa se movilizan desde el glucógeno por acción de la glucógeno fosforilasa. A continuación, la glucosa 1-fosfato se convierte en glucosa 6-fosfato.
7. La degradación y la síntesis del glucógeno están reguladas recíprocamente por hormonas. Las cinasas y las fosfatasas controlan las actividades de las enzimas interconvertibles glucógeno fosforilasa y glucógeno sintasa.
8. Los mamíferos mantienen una concentración casi constante de glucosa en la sangre. El hígado regula la cantidad de glucosa suministrada por la dieta, la gluconeogénesis y otros combustibles.

Problemas

1. Después de que se han agotado las reservas de glucógeno, ¿cuáles son los principales precursores gluconeogénicos de glucosa bajo las condiciones de: *a)* inanición y *b)* ejercicio intenso?

2. ¿Qué productos importantes del ciclo del ácido cítrico se requieren para la gluconeogénesis a partir de piruvato?

3. La epinefrina impulsa la utilización del glucógeno almacenado para glicólisis y producción de ATP en los músculos. ¿De qué modo impulsa la epinefrina el uso de las reservas de glucógeno en el hígado para generar la energía necesaria para los músculos en contracción?

4. *a)* En las células musculares, la insulina estimula una proteína cinasa que cataliza la fosforilación de la proteína fosfatasa-1, y así la activa. ¿Cómo afecta esto a la síntesis y la degradación de glucógeno en las células musculares?

b) ¿Por qué el glucagón regula selectivamente las enzimas en el hígado, pero no en otros tejidos?

c) ¿Cómo regula la glucosa la síntesis y la degradación del glucógeno hepático por vía de la proteína fosfatasa-1?

5. El glucagón, hormona polipéptida, se produce en el páncreas como respuesta a bajas concentraciones sanguíneas de glucosa. En las células hepáticas, el glucagón tiene un papel principal en la regulación de las velocidades de las rutas opuestas de glicólisis y gluconeogénesis, influyendo sobre las concentraciones de fructosa 2,6-*bi*fosfato (F2,6 BP). Si el glucagón causa disminución de F2,6 BP, ¿por qué resulta eso en un aumento de concentraciones de glucosa en la sangre?

6. Cuando aumenta la concentración de glucagón en la sangre ¿cuál(es) de las siguientes actividades enzimáticas disminuye(n)? Explique por qué.

Adenilil ciclasa

Proteína cinasa A

PFK-2 (actividad de cinasa)

Fructosa 1,6-*bi*fosfato

7. *a)* ¿Es mayor la energía requerida para sintetizar glucógeno a partir de glucosa 6-fosfato, que la obtenida cuando se degrada el glucógeno a glucosa 6-fosfato?

b) Durante el ejercicio, el glucógeno en las células musculares y hepáticas se puede convertir en metabolitos de glucosa para generación de ATP en los músculos. ¿El glucógeno del hígado y el de los músculos suministran las mismas cantidades de ATP a los músculos?

8. Los individuos con deficiencia total de glucógeno fosforilasa muscular (enfermedad de McArdle) no pueden hacer ejercicios arduos, porque se les presentan calambres musculares. En esos pacientes, el ejercicio causa aumento mucho mayor que el normal de ADP y P_i celulares. Además, el ácido láctico no se acumula en sus músculos. Explique los desequilibrios químicos en la enfermedad de McArdle.

9. Compare la cantidad de equivalentes de ATP generados en la descomposición de una molécula de glucosa 1-fosfato para formar dos moléculas de lactato con la cantidad de equivalentes de ATP requeridos para la síntesis de una molécula de glucosa 1-fosfato a partir de dos moléculas de lactato. (Suponga que las condiciones son anaeróbicas).

10. *a)* ¿Cómo permite el ciclo de la glucosa-alanina que el piruvato muscular se use para gluconeogénesis en el hígado, y regrese después a los músculos como glucosa?

b) En último término, ¿el ciclo de glucosa-alanina da más energía a los músculos que el ciclo de Cori?

11. Las enfermedades por almacenamiento de glucógeno (GSD, *glycogen storage disease*) debidas a deficiencias enzimáticas específicas pueden afectar el balance entre las reservas de glucógeno y la glucosa en la sangre. Dadas las siguientes enfermedades, indique qué efectos tiene cada una sobre: 1) la cantidad de glucógeno hepático almacenado y 2) las concentraciones de glucosa en la sangre.

a) Enfermedad de von Gierke (GSD-1a); enzima defectuosa: glucosa 6-fosfatasa.

b) Enfermedad de Cori (GSD III); enzima defectuosa: amilo-1,6-glucosidasa (enzima desramificadora).

c) Enfermedad de Hers (GSD VI); enzima defectuosa: fosforilasa hepática.

12. La ruta de las pentosas fosfato y la ruta glicolítica son independientes, pues tienen en común diversos metabolitos cuya concentración afecta la velocidad de las enzimas en ambas rutas. ¿Cuáles metabolitos son comunes para ambas rutas?

13. En muchos tejidos, una de las primeras respuestas a la lesión celular es un aumento rápido de las concentraciones de enzimas de la ruta de las pentosas fosfato. Diez días después de una lesión, el tejido cardiaco tiene concentraciones de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa que son 20 a 30 veces mayores que las normales, en tanto que las concentraciones de enzimas glucolíticas sólo son 10 a 20% de las normales. Sugiera una explicación de este fenómeno.

14. *a)* Dibuje las estructuras de los reactivos y productos para la segunda reacción catalizada por transcetolasa en la ruta de las pentosas fosfato. Indique cuáles carbonos son los que se transfieren.

b) Cuando entra 2-[^{14}C]-glucosa 6-fosfato a la ruta, ¿cuál átomo de fructosa 6-fosfato producido por la reacción de la parte *a)* queda marcado?

Lecturas seleccionadas

Gluconeogénesis

Hanson, R. W. y Reshef, L. (1997). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase (GTP) gene expression. *Annu. Rev. Biochem*. 66:581-611. Describe el control metabólico de la expresión genética.

Jitrapakdee, S. y Wallace, J. C. (1992). Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem. J.* 340:1-16.

Pilkis, S. J. y Granner, D. K. (1992). Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolisis. *Annu. Rev. Physiol.* 57:885-909.

Rothman, D. L., Magnusson, I., Katz, L. D., Shulman, R. G. y Shulman, G. I. (1991). Quantitation of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis in fasting humans with ^{13}C NMR. *Science* 254:573-576. Describe la operación continua de la ruta de gluconeogénesis en los humanos.

van de Werve, G., Lange, A., Newgard, C., Méchin, M. -C., Li, Y., y Berteloot, A. (2000). New lessons in the regulation of glucose metabolism taught by the glucose 6-phosphatase system. *Eur. J. Biochem.* 267:1533-1549. Explica por qué todavía queda mucho por aprender acerca del sitio catalítico y el transportador asociado con esta enzima.

Ruta de las pentosas fosfato

Wood, T. (1985). *The Pentose Phosphate Patway* (Orlando: Academic Press).

Wood, T. (1996). Physiological functions of the pentose phosphate pathway. *Cell Biochem. Func.* 4:241-247.

Metabolismo del glucógeno

Chou, J. Y., Matern, D., Mansfield, B. C. y Chen, Y. T. (2002). Type I glycogen storage diseases: disorders of the glucose 6-phosphate complex. *Curr. Mol. Med.* 2: 121-143.

Cohen, P., Alessi, D. R. y Cross, D. A. E. (1997). PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction? *FEBS Lett.* 410:3-10. Reseña los efectos de la insulina sobre el metabolismo muscular del glucógeno.

Johnson, L. N. y Barford, D. (1990). Glycogen phosphorylase: the structural basis of allosteric response and comparison with other allosteric proteins. *J. Biol. Chem*. 265:2409-2412.

Johnson, L. N., Lowe, E. D., Noble, M. E. M.y Owen, D. J. (1998). The structural basis for substrate recognition and control by protein kinases. *FEBS Lett.* 430:1-11. Describe la estructura y la acción de la fosforilasa cinasa.

Larner, J. (1990). Insulin and the stimulation of glycogen synthesis: the road from glycogen synthase to cyclic AMP-dependent protein kinase to insulin mediators. *Adv. Enzymol. Mol. Biol.* 63: 173-231. Una reseña sobre el control del metabolismo del glucógeno por la insulina.

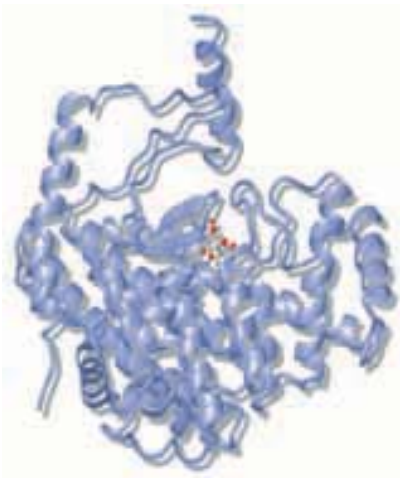
Lomako, J., Lomako, W. M. y Whelan, W. J. (2004). Glycogenin: the primer for mammalian and yeast glycogen synthesis. *Biochem. Biophys. Acta* 1673: 45-55.

Meléndez-Hevia, E., Waddell, T. G. y Shelton, E. D. (1993). Optimization of molecular design in the evolution of metabolism: the glycogen molecule. *Biochem. J.* 295:477-483.

Shepherd, P. R., Withers, D. J. y Siddle, K. (1998). Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem. J.* 333:471-490.

Smythe, C. y Cohen, P. (1991). The discovery of glycogenin and the priming mechanism for glycogen biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* 200:625-631.

Villar-Palasi C. y Guinovart, G. J.(1997). The role of glucose 6-phosphate in the control of glycogen synthase. *FASEB J.* 11:544-558.



13

capítulo trece

El ciclo del ácido cítrico

Los capítulos 11 y 12 se refirieron principalmente a la síntesis y degradación de carbohidratos, como la glucosa. Se vio que la ruta de biosíntesis que lleva a la glucosa comenzó con piruvato y oxaloacetato, y que el piruvato era el producto final de la glucólisis. En este capítulo se describirán las rutas de interconversión de numerosos ácidos orgánicos simples. Varios de esos compuestos son precursores esenciales para la biosíntesis de aminoácidos, ácidos grasos y porfirinas.

La acetil-CoA es uno de los compuestos intermedios clave en la interconversión de ácidos orgánicos pequeños. La acetil-CoA se forma por descarboxilación oxidativa del piruvato, con liberación de CO_2. Esta reacción es catalizada por la piruvato deshidrogenasa, enzima que se estudió brevemente en la sección 11.3 al describir el destino del piruvato. En este capítulo se comenzará con una descripción más detallada de esta importante enzima.

El grupo acetilo (un ácido orgánico de dos carbonos) de la acetil-CoA se puede transferir al ácido dicarboxílico oxaloacetato, de cuatro carbonos, para formar un nuevo ácido tricarboxílico llamado citrato (ácido cítrico). El citrato puede oxidarse entonces en una ruta de siete pasos, para regenerar oxaloacetato y liberar dos moléculas de CO_2. Después, el oxaloacetato se puede recombinar con otra molécula de acetil-CoA y se repiten las reacciones de oxidación del citrato. El efecto neto de esta ruta cíclica con ocho enzimas es la oxidación completa de un grupo acetilo a CO_2, y la transferencia de electrones a varios cofactores para formar equivalentes reductores. La ruta se llama **ciclo** del **ácido cítrico,** ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) o ciclo de Krebs, en honor de Hans Krebs, quien lo descubrió en la década de 1930.

Arriba: Citrato sintasa con su citrato producto en el sitio activo. Esta enzima cataliza el primer paso del ciclo del ácido cítrico. [PDB 1CTS].

El ciclo del ácido cítrico está en el centro del metabolismo de la energía, en las células eucariotas, en especial en los animales. La energía liberada en las oxidaciones del ciclo del ácido cítrico se conserva en su mayor parte como poder reductor, cuando las coenzimas $NAD^{\oplus}$ y ubiquinona (Q) se reducen y forman NADH y QH_2. Esta energía se deriva al fin y al cabo del piruvato (a través del acetil-CoA). Ya que el piruvato es el producto final de la glucólisis, se puede imaginar que el ciclo del ácido cítrico es una serie de reacciones que terminan la oxidación de la glucosa. La NADH y la QH_2 son sustratos en las reacciones del transporte de electrones asociado a membrana que llevan a la formación de un gradiente de protones, que impulsa la síntesis del ATP (capítulo 14).

Hans Krebs y W. A. Johnson propusieron el ciclo del ácido cítrico en 1937, para explicar varias observaciones desconcertantes. Se interesaron en comprender cómo se acopla la oxidación de la glucosa en las células musculares con la absorción de oxígeno. Antes, Albert Szent-Györgyi había descubierto que si se agrega un ácido dicarboxílico de cuatro carbonos, como succinato, fumarato u oxaloacetato, a una suspensión de músculo macerado, se estimulaba el consumo de O_2. El sustrato de la oxidación era carbohidrato, ya sea glucosa o glucógeno. Era en especial intrigante la observación de que al agregar pequeñas cantidades de ácidos dicarboxílicos de cuatro carbonos se consumían cantidades mayores de oxígeno que las necesarias para su propia oxidación. Eso indicaba que estos ácidos orgánicos de cuatro carbonos tenían efectos catalíticos. Krebs y Johnson observaron que el citrato ácido tricarboxílico de seis carbonos y el compuesto de cinco carbonos α-cetoglutarato también tenían un efecto catalítico sobre la utilización del O_2. Propusieron que se formaba citrato a partir de un intermedio con cuatro carbonos, y un derivado desconocido de la glucosa (que después se demostró que era acetil-CoA). La naturaleza cíclica de la ruta explicaba cómo podían actuar sus compuestos intermedios en forma catalítica sin consumirse. Albert Szent-Györgyi recibió el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1937 por su trabajo sobre la respiración, incluyendo el papel catalítico del fumarato en procesos de combustión biológica. A Hans Krebs se le otorgó el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1953, por descubrir el ciclo del ácido cítrico.

En las células musculares, los compuestos intermedios en el ciclo del ácido cítrico se usan casi exclusivamente en la ruta cíclica del metabolismo de la energía. En esas células, la maquinaria metabólica se dedica principalmente a extraer energía de la glucosa en forma de ATP. Por ello, fue posible reconocer la naturaleza cíclica de la ruta mediante experimentos con extractos de músculos. En otras células, los compuestos intermedios del ciclo del ácido cítrico son los puntos iniciales de muchas rutas de biosíntesis. Así, las enzimas del ciclo del ácido cítrico tienen un papel clave en las reacciones tanto anabólicas como catabólicas.

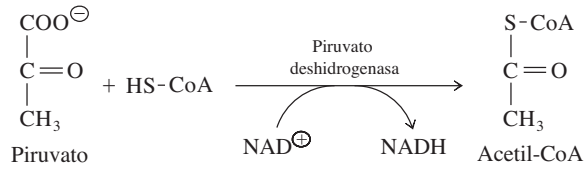
▲ Hans Krebs (1900-1981) recibió el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1953 por su descubrimiento del ciclo del ácido cítrico.

Muchas de estas mismas enzimas se encuentran en los procariotas, aunque pocas son las bacterias que poseen un ciclo completo del ácido cítrico. En este capítulo se examinarán las reacciones del ciclo del ácido cítrico, tal como suceden en las células de eucariotas. Se explorará la forma en que se regulan esas enzimas. Luego se presentarán las diversas rutas que requieren los compuestos intermedios del ácido cítrico, y se examinará la relación de esas rutas con las reacciones principales de la ruta cíclica en eucariotas, y las rutas parciales en bacterias. También se analizarán rutas donde interviene glioxilato, en especial la desviación del glioxilato y el ciclo del glioxilato. Esas rutas se relacionan en forma estrecha con el ciclo del ácido cítrico. Por último, se describirá la evolución de las enzimas en el ciclo del ácido cítrico.

13.1 Conversión de piruvato en acetil-CoA

El piruvato es un sustrato clave en varias reacciones, según se describió en la sección 11.3. En este capítulo se tratará la conversión de piruvato en acetil-CoA, ya que la acetil-CoA es el sustrato principal en el ciclo del ácido cítrico. La reacción es catalizada

por un complejo grande de enzimas y cofactores, llamado complejo de la piruvato deshidrogenasa. La estequiometría general de la reacción completa es



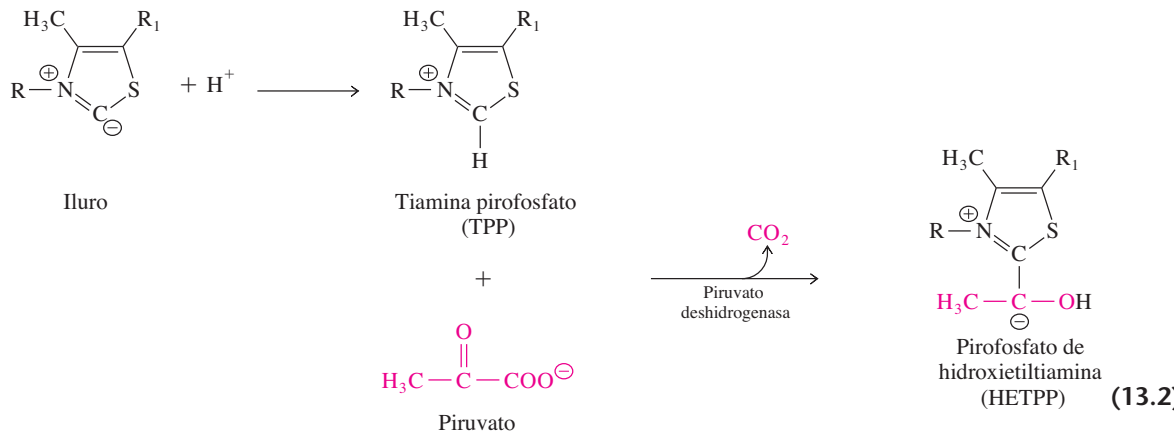
(13.1)

donde HS-CoA es la coenzima A. Es el primer paso en la oxidación del piruvato, y los productos de la reacción son acetil-CoA, una molécula de dióxido de carbono y una molécula de equivalente reductor (NADH). La reacción de piruvato deshidrogenasa es de óxido-reducción. En este caso, la oxidación del piruvato a CO_2 se acopla con la reducción de $NAD^{\oplus}$ a NADH. El resultado neto es la transferencia de dos electrones, del piruvato al NADH.

Los nombres sistemáticos de las enzimas en el complejo son piruvato lipoamida 2-oxidorreductasa (E_1); acetil-CoA:dihidrolipoamida S-acetiltransferasa (E_2); y dihidrolipoamida:$NAD^{\oplus}$ oxidorreductasa (E_3).

El complejo de piruvato deshidrogenasa es un complejo multienzimático que contiene varias copias de tres actividades enzimáticas distintas: piruvato deshidrogenasa (subunidades E_1), dihidrolipoamida acetiltransferasa (subunidades E_2) y dihidrolipoamida deshidrogenasa (subunidades E_3). La descarboxilación oxidativa del piruvato se puede dividir en cinco pasos. (En cada paso, en las siguientes reacciones, se indican en gris los destinos de los átomos procedentes del piruvato).

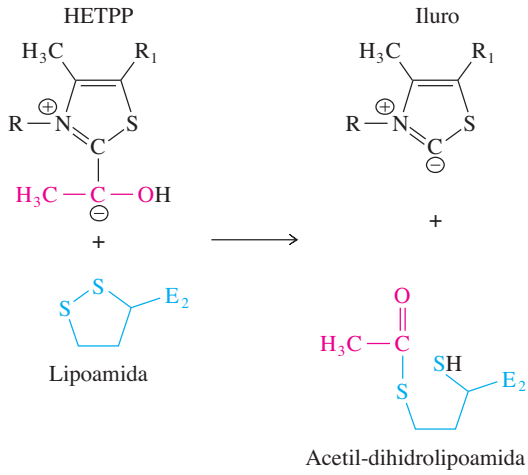
1. El componente E_1 contiene el grupo prostético pirofosfato de tiamina (TPP, *thiamine pyrophosphate*). Según se vio en el capítulo 7, la TPP (vitamina B_1) tiene función catalítica en varias reacciones de la descarboxilasa. La reacción inicial causa la formación de un compuesto intermedio de hidroxietilo—TPP y la liberación de CO_2.



(13.2)

Obsérvese que la forma reactiva de TPP es la forma de carbanión o iluro. La forma de carbanión es relativamente estable debido al ambiente único de la coenzima unida a la proteína (sección 7.6). El producto del primer paso es la forma carbanión del hidroxietilo—TPP. El mecanismo se parece al de la piruvato descarboxilasa (figura 7.15).

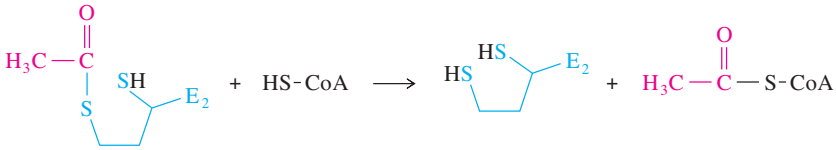
2. En el segundo paso, el grupo hidroxietilo, con dos carbonos, es transferido al grupo lipoamida de E_2. El grupo lipoamida está formado por ácido lipoico unido en forma covalente por un enlace de amida a un residuo de lisina en una subunidad E_2 (figura 7.26). Esta coenzima en especial sólo se encuentra en enzimas de piruvato deshidrogenasa y afines. La reacción de transferencia es catalizada por el componente E_1 del complejo piruvato deshidrogenasa.



(13.3)

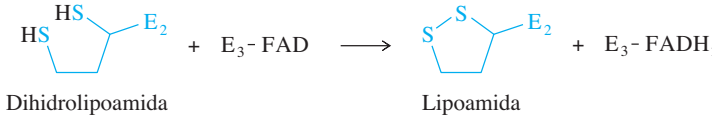
En esta reacción, la oxidación del hidroxietilo—TPP se acopla con la reducción del disulfuro de la lipoamida y el grupo acetilo se transfiere a uno de los grupos sulfhidrilo de la coenzima.

3. El tercer paso consiste en la transferencia del grupo acetilo al HS—CoA, formando acetil-CoA y dejando a la lipoamida en la forma reducida de ditiol. El componente E_2 del complejo es el que cataliza esta reacción.



(13.4)

4. La lipoamida reducida de E_2 debe volver a oxidarse a fin de regenerar el grupo prostético para que pueda participar en más reacciones. Eso se hace en el paso 4 por transferencia de dos protones y dos electrones de la forma ditiol de la lipoamida al FAD (flavina adenina dinucleótido). El FAD es el grupo prostético de E_3 y la reacción redox produce la coenzima reducida $(FADH_2)$. (Recuérdese, según la sección 7.5, que el $FADH_2$ lleva dos electrones y dos protones que en general se adquieren como un solo protón y un ion hidruro).



(13.5)

5. En el paso final se vuelve a oxidar E_3—$FADH_2$ para formar FAD. Esta reacción se acopla con la reducción de $NAD^{\oplus}$.

$$E_3\text{—}FADH_2 + NAD^{\oplus} \longrightarrow E_3\text{—}FAD + NADH + H^{\oplus} \qquad \textbf{(13.6)}$$

La oxidación de E_3—$FADH_2$ regenera el complejo original de piruvato deshidrogenasa, completando el ciclo catalítico. En el paso 5 se producen NADH y $H^{\oplus}$. Un protón se libera en el paso 5, y un protón se toma en el paso 1, por lo que la estequiometría general de la reacción de piruvato deshidrogenasa no tiene ganancia ni pérdida neta de protones (ecuación 13.1).

La acción recíproca de cinco coenzimas en el complejo de la piruvato deshidrogenasa ilustra la importancia que tienen las coenzimas en las reacciones metabólicas. Dos de ellas son cosustratos (HS—CoA y $NAD^{\oplus}$), y tres son grupos prostéticos (TPP, lipoamida y FAD: un cofactor unido a cada tipo de subunidad). Los grupos lipoamida unidos a E_2 son los principales responsables de transferir reactivos de un sitio activo a otro en el complejo. Una lipoamida toma una unidad de dos carbonos del hidroxietilo—TPP en el paso 2 para formar el compuesto intermedio de acetil-dihidrolipoamida. Este intermedio se reposiciona en el sitio activo de la dihidrolipoamida acetiltransfrasa, donde el grupo de dos carbonos es transferido a la coenzima A en el paso 3. La lipoamida reducida que se produce en esa reacción se traslada entonces al sitio activo de la dihidrolipoamida deshidrogenasa en E_3. Se vuelve a oxidar la lipoamida en el paso 4, y la coenzima regenerada se vuelve a colocar en el sitio activo de E_1, donde queda lista para recibir un nuevo grupo de dos carbonos. En estas reacciones, el grupo prostético lipoamida funciona como un brazo oscilante que visita los tres sitios activos en el complejo de piruvato deshidrogenasa (figura 13.1). La parte del brazo oscilante en la subunidad E_2 consiste en una cadena flexible de polipéptidos que contiene el residuo de lisina con el que se enlaza la lipoamida en forma covalente.

La canalización y los complejos de multienzimas se describieron en la sección 5.11.

Las diversas subunidades del complejo están arregladas en una forma que facilita el mecanismo de brazo oscilante de la lipoamida. El mecanismo asegura que el producto de una reacción no se difunda al medio, sino que sobre él actúe de inmediato el siguiente componente del sistema. Es una forma de canalización, donde el producto de una reacción se convierte en sustrato de una segunda reacción, pero difiere de los demás ejemplos porque, en este caso, el compuesto intermedio de dos carbonos se une en forma covalente al grupo flexible de lipoamida en E_2.

Toda la reacción de piruvato deshidrogenasa es una serie de reacciones de óxido-reducción acopladas, donde se transportan electrones del sustrato inicial (piruvato) al agente oxidativo final ($NAD^{\oplus}$). Las cuatro semirreacciones son

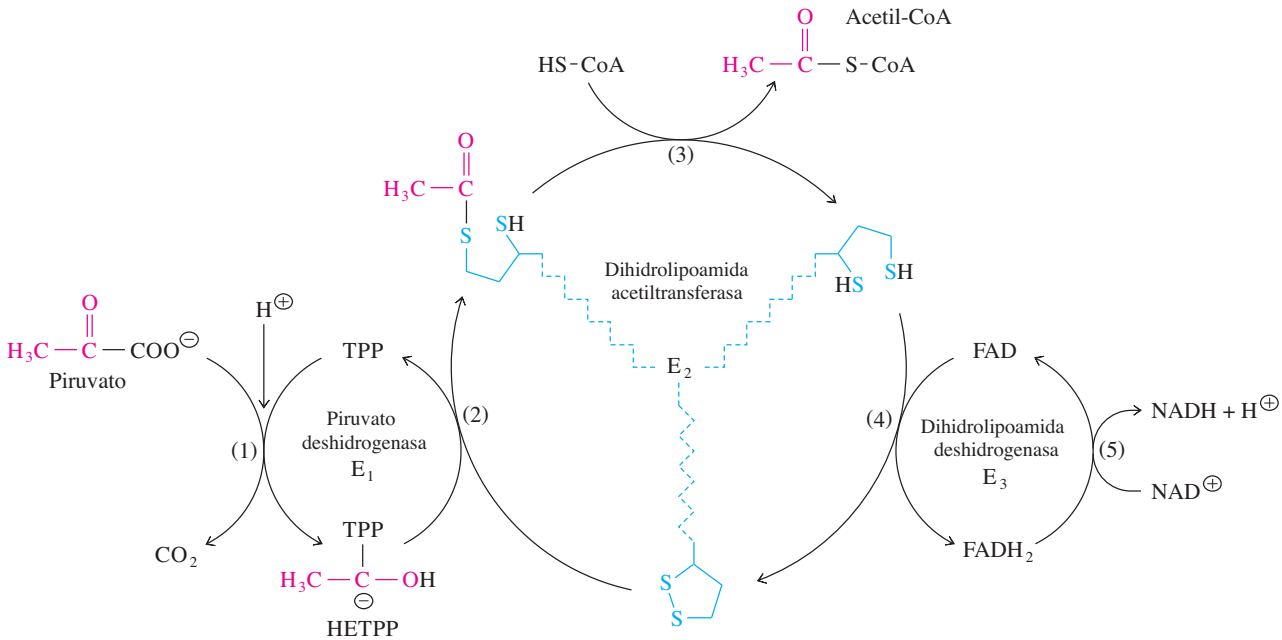


Figura 13.1 ▲
Reacciones del complejo piruvato deshidrogenasa. El grupo prostético lipoamida (en gris claro) está unido por un enlace amida entre el ácido lipoico y la cadena lateral de un residuo de lisina de E_2. El grupo prostético es un brazo oscilante que lleva la unidad con dos carbonos del sitio activo de la piruvato deshidrogenasa al sitio activo de la dihidrolipoamida acetiltransferasa. Después, el brazo lleva hidrógeno al sitio activo de la dihidrolipoamida deshidrogenasa.

1. acetil-CoA + CO_2 + $H^{\oplus}$ + $2e^{\ominus}$ ⟶ piruvato + CoA
2. E_2—lipoamida + $2H^{\oplus}$ + $2e^{\ominus}$ ⟶ E_2—dihidrolipoamida
3. E_3—FAD + $2H^{\oplus}$ + $2e^{\ominus}$ ⟶ E_3—$FADH_2$
4. $NAD^{\oplus}$ + $2H^{\oplus}$ + $2e^{\ominus}$ ⟶ NADH + $H^{\oplus}$ **(13.7)**

Cada media reacción tiene un potencial estándar de reducción característico (tabla 10.4) que da cierta indicación sobre la dirección del flujo de electrones. (Recuérdese, de la sección 10.9, que los potenciales reales de reducción dependen de las concentraciones de los agentes oxidantes y los agentes reductores). El transporte de electrones comienza con el piruvato, que cede dos electrones en la inversa de la semirreacción 1. Esos electrones son tomados por E_2—lipoamida. El flujo posterior de electrones es de E_2—lipoamida a E_3—FAD y a $NAD^{\oplus}$. El producto final es NADH, que lleva un par de electrones. Hay muchos ejemplos de sistemas simples de transporte de electrones como este en las enzimas de rutas metabólicas. No deben confundirse con el sistema de transporte de electrones asociado a membrana, mucho más complejo, que se describirá en el capítulo 14.

El tamaño del complejo de piruvato deshidrogenasa es enorme. Es varias veces mayor que un ribosoma. En las bacterias, esos complejos están en el citosol, y en las células de eucariotas se encuentran en la matriz mitocondrial. También en los cloroplastos hay complejos de piruvato deshidrogenasa.

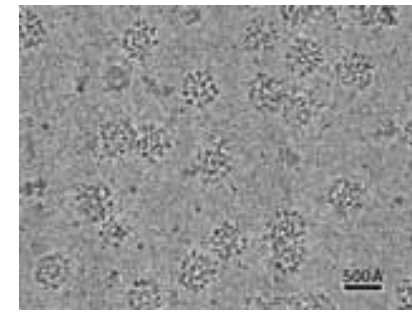
El complejo eucariótico de piruvato deshidrogenasa es el mayor complejo multienzimático conocido. El núcleo del complejo está formado por 60 subunidades E_2 dispuestas en forma de un dodecaedro pentagonal (12 pentágonos unidos por sus orillas formando una pelota). Esta forma tiene 20 vértices y cada uno está ocupado por un trímero de E_2 (figura 13.2A, página siguiente). Cada una de las subunidades E_2 tiene una región enlazante que sobresale hacia arriba de la superficie. Este enlazante toca un anillo externo de subunidades E_1 que rodean al núcleo interno (figura 13.2B). La región enlazante contiene al brazo oscilante de lipoamida.

La capa externa tiene 60 subunidades E_1. Cada enzima E_1 toca a una de las enzimas E_2 subyacentes y hace contactos adicionales con sus vecinas. La enzima E_1 consiste en dos subunidades α y dos subunidades β $(\alpha_2\beta_2)$, por lo que es bastante más grande que la enzima E_2 en el núcleo. La enzima E_3 (un dímero de α_2) está en el centro del pentágono formado por las enzimas nucleares E_2. Hay 12 enzimas E_3 en el complejo total que corresponden a los 12 pentágonos del dodecaedro pentagonal. En los eucariotas, las enzimas E_3 se asocian a una pequeña proteína enlazante (BP, *binding protein*) que es parte del complejo.

El modelo de la figura 13.2 se ha construido a partir de imágenes de microscopia electrónica de alta resolución, tomadas a complejos de piruvato deshidrogenasa a bajas temperaturas (crio-EM). En esta técnica, una gran cantidad de imágenes individuales se combinan y con ellas se construye una imagen tridimensional con ayuda de una computadora. A continuación se compara el modelo con las estructuras de cualquiera de las subunidades individuales que se han resuelto mediante cristalografía de rayos X o con resonancia magnética nuclear. Hasta ahora no ha sido posible obtener cristales grandes del complejo entero de piruvato deshidrogenasa en la Tierra, pero se hacen experimentos para cultivar cristales en la Estación Espacial Internacional, donde la ausencia de gravedad podría permitir mejores resultados.

En muchas especies de bacterias existe un complejo parecido de piruvato deshidrogenasa, aunque algunas, como las gramnegativas, tienen una versión más pequeña, donde sólo hay 24 enzimas E_2 en el núcleo. En esas bacterias, las enzimas nucleares están ordenadas en forma de un cubo, con un trímero en cada uno de los ocho vértices. Las subunidades E_2 de las dos distintas enzimas bacterianas y las versiones mitocondriales eucarióticas y de cloroplastos se relacionan estrechamente. Sin embargo, las enzimas bacterianas gramnegativas contienen enzimas E_1 que no están relacionadas con las versiones eucarióticas.

La piruvato deshidrogenasa es un miembro de una familia de complejos multienzimáticos llamados familia de la 2-oxo ácido deshidrogenasa. (El piruvato es el más pequeño ácido orgánico 2-oxo). Se encontrarán otros dos 2-oxo (o α-ceto) ácido



▲Micrografía electrónica de complejos de piruvato deshidrogenasa procedentes de *E. coli.*

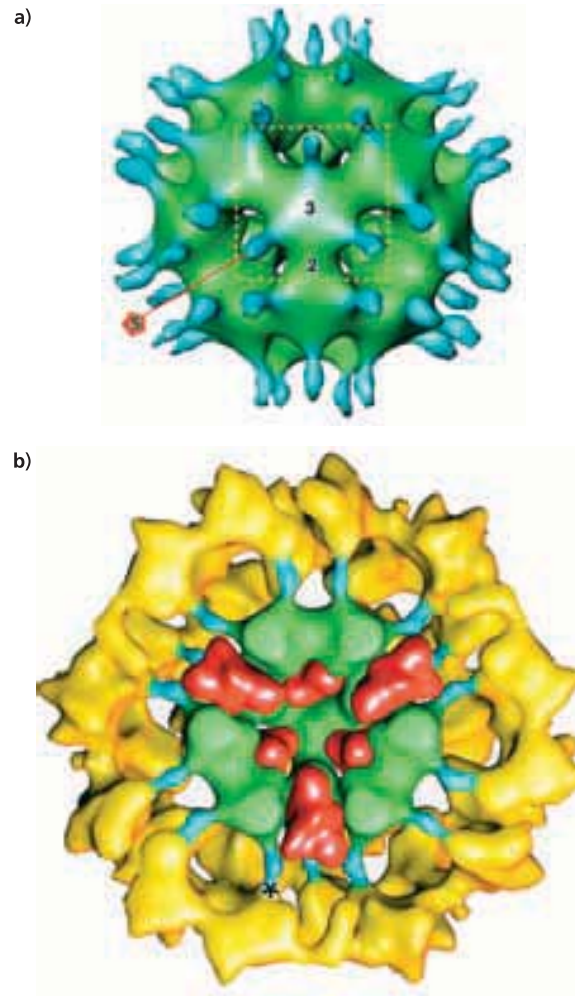


Figura 13.2 ▶
Modelo estructural del complejo de piruvato deshidrogenasa. **a)** El núcleo interno consiste en 60 enzimas E_2 ordenadas en la forma de un dodecaedro pentagonal, con un trímero E_2 en cada uno de los 20 vértices. Se indica un solo trímero con un marcador amarillo. El centro de la forma pentagonal se indica con el pentágono rojo. Nótense las regiones de enlazamiento que sobresalen hacia arriba, desde la superficie de la estructura nuclear. **b)** Corte del complejo completo, mostrando las enzimas exteriores E_1 (amarillo) y las enzimas BP-E_3 (rojo) ubicadas en el espacio entre las enzimas E_2 del núcleo interno. [Según Zhou, H. Z. et al. (2001). The remarkable structural and functional organization of the eukaryotic pyruvate dehydrogenase complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (USA) 98, 14082-14087]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

La regulación de la piruvato deshidrogenasa se examina en la sección 13.5.

deshidrogenasas que se parecen mucho a la piruvato deshidrogenasa en estructura y función. Una es una enzima del ciclo del ácido cítrico, la α-cetoglutarato deshidrogenasa (sección 13.4, parte 4) y la otra es una α-ceto ácido deshidrogenasa, de cadena ramificada, que se usa en el metabolismo de aminoácidos (sección 17.10E). Todos los miembros de la familia catalizan reacciones irreversibles en esencia, donde un ácido orgánico se oxida a CO_2 y se forma un derivado de coenzima A rico en energía. La reacción contraria es catalizada en algunas bacterias por la ruta de acetil-CoA/monóxido de carbono deshidrogenasa. Este es un mecanismo para fijar dióxido de carbono en bacterias anaeróbicas.

Algunas bacterias y algunos eucariotas anaeróbicos convierten piruvato en acetil-CoA y CO_2 usando piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, enzima que no se relaciona con la piruvato deshidrogenasa. El portador terminal de electrones en este caso es la ferredoxina reducida (Fd_{red}) y no NADH, como en la piruvato deshidrogenasa. La reacción de piruvato:ferredoxina oxidorreductasa es reversible y se puede usar para fijar CO_2 por carboxilación reductora. Unas especies bacterianas que se apartaron en época muy temprana en la historia de la vida a menudo contienen piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, y no piruvato deshidrogenasa, lo que sugiere que la primera enzima es más primitiva, y que la piruvato deshidrogenasa evolucionó después.

En las células bacterianas, el piruvato se convierte en acetil-CoA en el citosol, pero en las células eucarióticas el complejo de piruvato deshidrogenasa está en mitocondrias (y en cloroplastos). Primero debe importarse piruvato a las mitocondrias (o a los cloroplastos) para que pueda servir como sustrato en la reacción. Una mitocondria está encerrada por una membrana doble. Las moléculas pequeñas, como las de piruvato, atraviesan la

membrana externa por canales acuosos formados por proteínas transmembranales, llamadas porinas (sección 9.11A). Esos canales permiten la libre difusión de moléculas con pesos menores que 10 000. Sin embargo, para atravesar la membrana interna se requiere una proteína específica de transporte para la mayor parte de los metabolitos. La piruvato translocasa transporta el piruvato en forma específica, en simporte con $H^{\oplus}$. Una vez dentro de la mitocondria, el piruvato se puede convertir en acetil-CoA y CO_2. En las células eucarióticas, las enzimas del ciclo del ácido cítrico también están en las mitocondrias.

13.2 Oxidación de la acetil-CoA en el ciclo del ácido cítrico

El acetil-CoA formado a partir de piruvato o de otros compuestos (como ácidos grasos o algunos aminoácidos) se puede oxidar en el ciclo del ácido cítrico. La lista de las ocho reacciones de ese ciclo se muestran en la tabla 13.1 y en la figura 13.3, de la siguiente página. Antes de examinar cada una de las reacciones se deben considerar dos propiedades generales de la ruta: el flujo del carbono y la producción de moléculas ricas en energía.

En la figura 13.4 se representan los destinos de los átomos de carbono. En la primera reacción del ciclo del ácido cítrico, el grupo acetilo, con dos carbonos, de la acetil-CoA, se transfiere al ácido dicarboxílico oxaloacetato de cuatro carbonos para formar citrato, un ácido tricarboxílico de seis carbonos. El ciclo avanza con la descarboxilación oxidativa de un ácido de seis carbonos y uno de cinco carbonos. De esta forma se liberan dos moléculas de CO_2 y se produce succinato, un ácido dicarboxílico de cuatro carbonos. Los pasos restantes del ciclo convierten al succinato en oxaloacetato, el reactivo original con que se inició el ciclo.

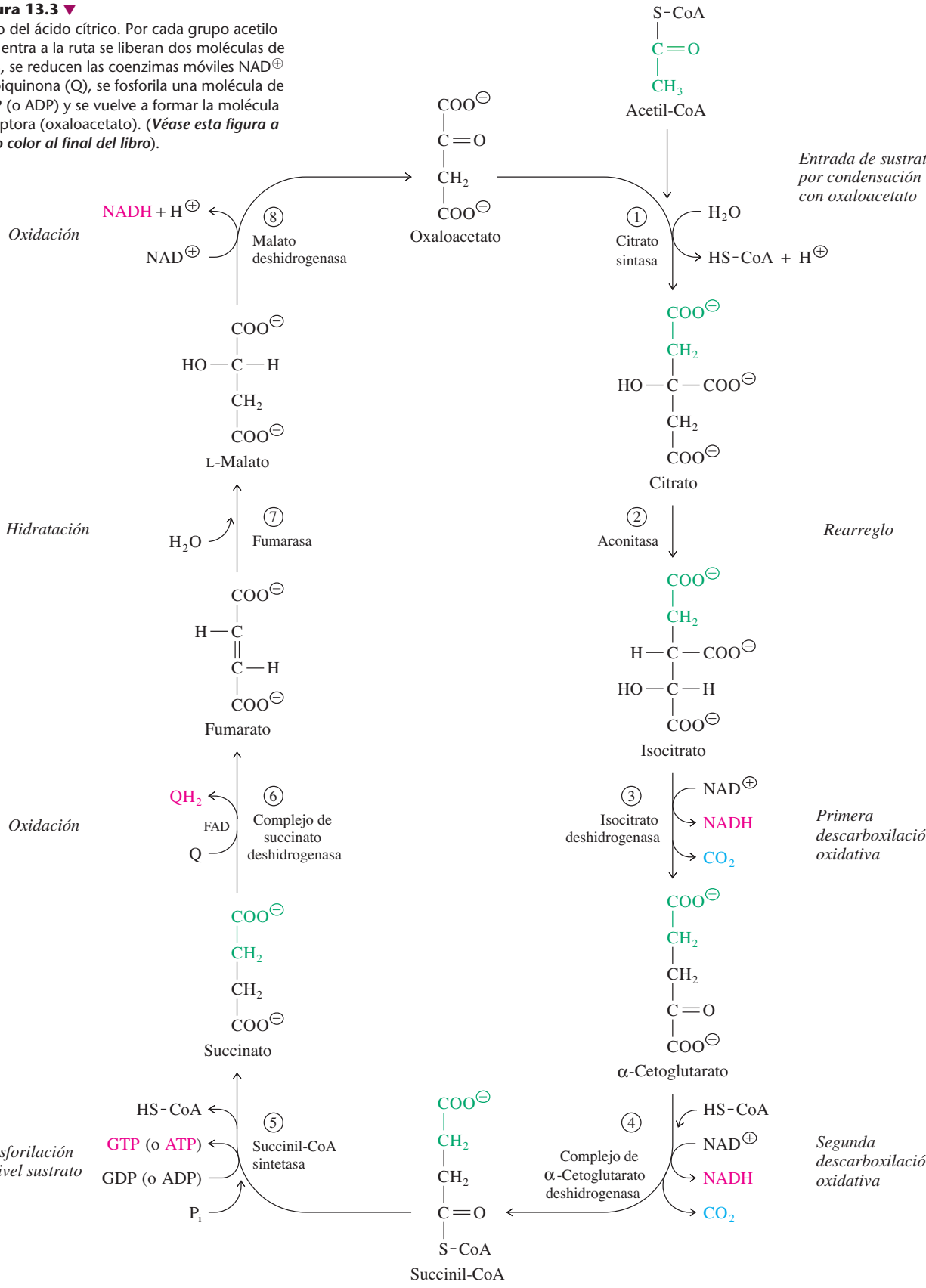
Nótese que los dos átomos de carbono que entran en el ciclo como grupo acetilo de la acetil-CoA no son los mismos átomos de carbono que se pierden como CO_2. Sin embargo, el balance de carbono en la ruta total de reacciones es tal que por cada grupo de dos carbonos de la acetil-CoA que entra al ciclo, se liberan dos átomos de carbono durante una vuelta completa al ciclo. Los dos átomos de carbono de la acetil-CoA se convierten en la mitad del ácido dicarboxílico simétrico de cuatro carbonos (succinato) en el quinto paso del ciclo. Las dos mitades de esta molécula simétrica son químicamente equivalentes, así que los carbonos procedentes de la acetil-CoA se distribuyen uniformemente en las moléculas formadas a partir del succinato.

La acetil-CoA es una molécula rica en energía (sección 10.8). El enlace de tioéster conserva algo de la energía adquirida por descarboxilación del piruvato mediante el complejo de piruvato deshidrogenasa. La ecuación neta del ciclo del ácido cítrico (tabla 13.1) tiende a confundir el hecho de que el ciclo del ácido cítrico equivale a la oxidación de una

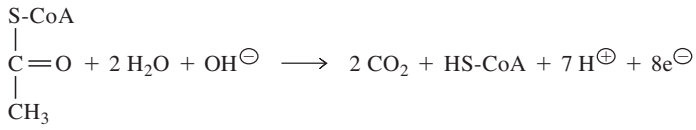
TABLA 13.1 Reacciones enzimáticas en el ciclo del ácido cítrico

Reacción	Enzima
1. Acetil-CoA + Oxaloacetato + $H_2O \longrightarrow$ Citrato + HS-CoA + $H^{\oplus}$	Citrato sintasa
2. Citrato $\rightleftharpoons$ Isocitrato	Aconitasa (Aconitato hidratasa)
3. Isocitrato + $NAD^{\oplus} \longrightarrow$ α-Cetoglutarato + NADH + CO_2	Isocitrato deshidrogenasa
4. α-Cetoglutarato + HS-CoA + $NAD^{\oplus} \longrightarrow$ Succinil-CoA + NADH + CO_2	Complejo de α-Cetoglutarato deshidrogenasa
5. Succinil-CoA + GDP (o ADP) + $P_i \rightleftharpoons$ Succinato + GTP(o ATP) + HS-CoA	Succinil-CoA sintetasa
6. Succinato + Q $\rightleftharpoons$ Fumarato + QH_2	Complejo succinato deshidrogenasa
7. Fumarato + $H_2O \rightleftharpoons$ L-Malato	Fumarasa (fumarato hidratasa)
8. L-Malato + $NAD^{\oplus} \rightleftharpoons$ Oxaloacetato + NADH + $H^{\oplus}$	Malato deshidrogenasa
Ecuación neta:	
Acetil-CoA + 3 $NAD^{\oplus}$ + Q + GDP (o ADP) + P_i + 2 $H_2O \longrightarrow$ HS-CoA + 3 NADH + QH_2 + GTP (o ATP) + 2 CO_2 + 2 $H^{\oplus}$	

Figura 13.3 ▼
Ciclo del ácido cítrico. Por cada grupo acetilo que entra a la ruta se liberan dos moléculas de CO_2, se reducen las coenzimas móviles $NAD^{\oplus}$ y ubiquinona (Q), se fosforila una molécula de GDP (o ADP) y se vuelve a formar la molécula receptora (oxaloacetato). (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).



molécula de acetil-CoA con liberación de electrones. La secuencia total de reacciones se puede simplificar como sigue:



(13.8)

donde el grupo hidroxilo es cedido por el fosfato inorgánico en la reacción 5, y algunos de los productos se muestran como protones libres y electrones libres. Esta forma de la ecuación neta revela que se liberan ocho electrones durante la oxidación. (Recuérdese que las reacciones de oxidación liberan electrones, y las reacciones de reducción captan electrones). Seis de los electrones se transfieren a tres moléculas de $NAD^{\oplus}$ junto con tres de los protones ilustrados en la ecuación 13.8. Los dos electrones restantes se transfieren a una molécula de ubiquinona (Q) junto con dos de los protones. Se producen dos protones libres en cada vuelta al ciclo. (Téngase en mente que las moléculas de dióxido de carbono producidas durante el ciclo del ácido cítrico no provienen en forma directa de la acetil-CoA. La ecuación 13.8 es una versión simplificada de las reacciones donde se hace destacar la oxidación neta).

La mayor parte de la energía liberada en las reacciones del ciclo del ácido cítrico se conserva en forma de electrones transferidos desde ácidos orgánicos, para generar las coenzimas reducidas NADH y QH_2 (figura 13.4). El NADH se forma por la reducción del $NAD^{\oplus}$ en tres pasos de óxido-reducción; dos de ellos son descarboxilaciones oxidativas. La QH_2 se forma cuando se oxida succinato a fumarato. La oxidación posterior de las coenzimas reducidas, por transporte de electrones asociado a membrana, lleva a la transferencia de electrones del NADH y la QH_2 a un aceptor terminal de electrones. En el caso de la mayoría de los eucariotas (y muchos procariotas), este aceptor terminal de electrones es oxígeno, que se reduce a agua. El transporte de electrones asociado a membrana se acopla a la producción de ATP a partir de ADP y P_i. A todo el proceso (transporte de electrones + fosforilación del ADP) se le llama con frecuencia fosforilación oxidativa cuando está presente el oxígeno (capítulo 14). Además de la formación de los equivalentes reductores, el ciclo del ácido cítrico produce un nucleótido trifosfato en forma directa por fosforilación a nivel sustrato. El producto puede ser ATP o GTP, dependiendo del tipo o especie celular.

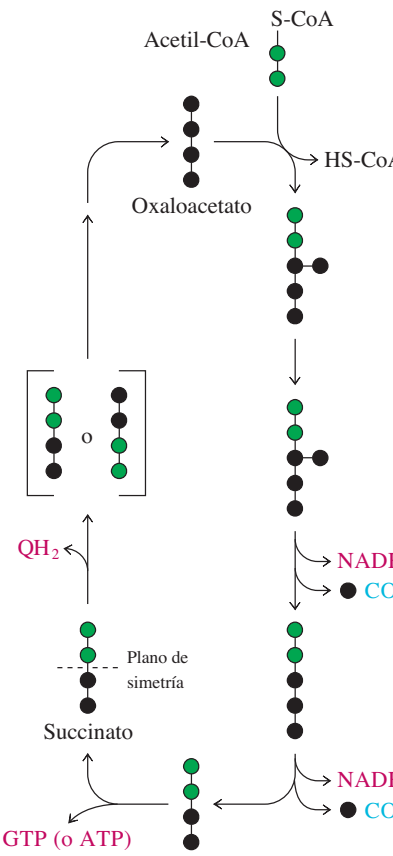


Figura 13.4 ▲
Destinos de los átomos de carbono del oxaloacetato y la acetil-CoA durante una vuelta del ciclo del ácido cítrico. El plano de simetría del succinato indica que las dos mitades de la molécula son químicamente equivalentes; así, los átomos de carbono de la acetil-CoA (en gris) se distribuyen uniformemente en los productos intermedios de cuatro carbonos que llevan al oxaloacetato. Los átomos de carbono de la acetil-CoA que entran en una vuelta del ciclo se pierden como CO_2 sólo en la segunda vuelta y las siguientes. Se conserva la energía en las coenzimas reducidas NADH y QH_2, y en un GTP (o ATP) producido por fosforilación a nivel de sustrato.

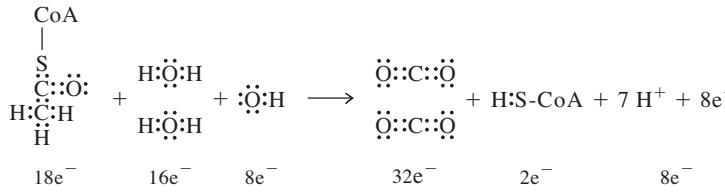
13.3 Enzimas del ciclo del ácido cítrico

Se puede considerar que el ciclo del ácido cítrico es una reacción catalítica de varias etapas, que regresa a su estado original después de oxidar una molécula de acetil-CoA. Esta imagen se basa en que cuando las reacciones funcionan como un ciclo, el reactivo original, que es oxaloacetato, se regenera. Por definición, un catalizador aumenta la velocidad de una reacción sin sufrir él mismo una transformación neta. Todas las reacciones enzimáticas, de hecho todas las reacciones catalíticas, se pueden representar como ciclos. Una enzima pasa por una serie cíclica de conversiones y por último regresa a la forma que tenía al empezar. En este sentido, el ciclo del ácido cítrico se ajusta a la descripción de un catalizador. En total, el ciclo del ácido cítrico se puede considerar como un mecanismo para oxidar al grupo acetilo de la acetil-CoA y formar CO_2, mediante $NAD^{\oplus}$ y ubiquinona. Cuando el ciclo del ácido cítrico opera aislado, se vuelven a formar sus compuestos intermedios con cada vuelta completa al ciclo. El resultado es que el ciclo del ácido cítrico no es una ruta para la siguiente síntesis o degradación de alguno de los compuestos intermedios en la ruta, a diferencia de, por ejemplo, la ruta de la gluconeogénesis, o la ruta de la glucólisis. En la sección 13.6 se verá que la ruta del ácido cítrico no siempre funciona en aislamiento. Algunos de los compuestos intermedios son compartidos con otras rutas. Primero se examinará el aspecto catalítico del ciclo del ácido cítrico, con atención en cada uno de los ocho pasos enzimáticos.

RECUADRO 13.1 ¿De dónde vienen los electrones?

Las ecuaciones de reacción química, como la 13.8, no ayudan mucho para comprender de dónde se liberan y de dónde se toman los electrones. Para ver el balance de electrones en esas reacciones, con frecuencia se aconseja dibujar las estructuras con los electrones de valencia, reemplazando las líneas que representan a los enlaces químicos en la mayor parte de los dibujos. Cada enlace covalente está formado por un par compartido de electrones, y cada uno de los átomos normales (C, O, N, S) requiere ocho electrones de valencia. Los enlaces que implican átomos de hidrógeno sólo tienen un par de electrones en la única capa del hidrógeno.

La oxidación de la acetil-CoA de la Reacción 13.8 se muestra en esta forma en la figura adjunta. Sólo se muestran los electrones de las capas externas en los átomos. Esos electrones son los que se eliminan en oxidaciones o que se añaden en reducciones. Hay 42 electrones (21 pares) en los reactivos, y 34 electrones (17 pares) en los productos CO_2 y coenzima A. Así, en la oxidación se liberan 8 electrones. La mayor parte de las veces los electrones se liberan cuando se forman dobles enlaces (como en el dióxido de carbono), ya que eso da como resultado compartir un par adicional de electrones.



▲ Oxidación de un equivalente de acetil-CoA en el ciclo del ácido cítrico, mostrando los electrones de valencia en los reactivos y los productos.

1. Citrato sintasa

La primera reacción del ciclo del ácido cítrico, la acetil-CoA reacciona con oxaloacetato y agua para formar citrato, HS-CoA y un protón. La citrato sintasa cataliza esta reacción, y da como resultado un compuesto intermedio unido a enzima, llamado citril-CoA (figura 13.5).

El citrato es el primero de dos ácidos tricarboxílicos que son parte del ciclo. El cambio de energía libre de Gibbs estándar $(\Delta G^{\circ\prime})$ para la reacción de citrato sintasa es -31.5 kJ mol^{-1} debido a la hidrólisis del enlace tioéster de alta energía, en el intermedio citril-CoA. En el caso normal cabría esperar que un cambio de energía libre de Gibbs tan grande se acoplara a la síntesis de ATP, teniendo en cuenta que el cambio real de energía libre de Gibbs dentro de la célula podría ser muy diferente. En realidad, la hidrólisis del enlace tioéster parecido en la succinil-CoA (paso 5 del ciclo del ácido cítrico), se acopla a la síntesis de GTP (o de ATP). Sin embargo, en el caso de la reacción de citrato sintasa, la energía disponible se usa para un fin distinto. Asegura que la reacción avance en la dirección de síntesis de citrato cuando la concentración de oxaloacetato es muy

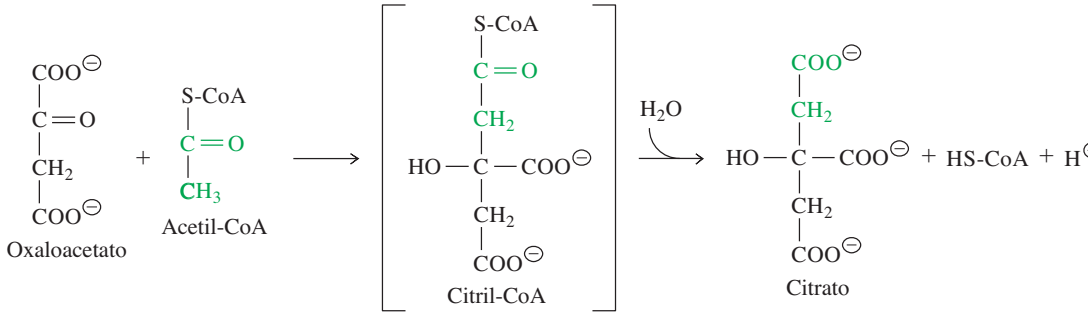


Figura 13.5 ▲
Reacción catalizada por la citrato sintasa. En el primer paso, la acetil-CoA se combina con oxaloacetato para formar un compuesto intermedio unido a la enzima, citril-CoA. Este tioéster rico en energía se hidroliza para liberar los productos citrato y HS-CoA. La hidrólisis de la citril-CoA impulsa hacia su terminación a la reacción de la citrato sintasa.

baja. Ese parece ser el caso normal cuando funciona el ciclo del ácido cítrico. En presencia de sólo cantidades pequeñas (catalíticas) de oxaloacetato, el equilibrio de la reacción ilustrada en la figura 13.5 sigue favoreciendo a la síntesis de citrato, porque la reacción en esta dirección es muy exergónica. En otras palabras, el cambio real de energía libre de Gibbs dentro de la célula se acerca mucho más a cero que lo que indica el cambio de energía libre de Gibbs estándar. La naturaleza muy exergónica de la reacción bajo condiciones estándar asegura que el ciclo del ácido cítrico funcione en la dirección de oxidación de acetil-CoA, aun bajo condiciones donde la concentración de oxaloacetato sea muy baja.

La citrato sintasa es una transferasa, una de las categorías de enzimas descritas en la sección 5.1. Las liasas catalizan la ruptura de sustratos en reacciones simples de eliminación que *no* son de óxido-reducción, y que *no* se acoplan a hidrólisis de ATP. El término "sintasa" se usa para liasas cuyo papel principal es la reacción inversa donde se combinan dos sustratos para formar una molécula mayor. Por otro lado, las "sintetasas" son miembros de la categoría enzimática de ligasas (sección 5.1). Las reacciones catalizadas por las sintetasas deben acoplarse con la hidrólisis de ATP (o GTP). Es importante recordar la diferencia entre las sintasas y las sintetasas, porque las palabras se parecen mucho y porque el ciclo del ácido cítrico contiene un ejemplo de cada tipo de enzima. (Por alguna razón, es más fácil pronunciar "sintetasa," y queda uno tentado a adicionar la sílaba extra cuando se debe decir "sintasa").

En las bacterias grampositivas, arqueobacterias y eucariotas, la citrato sintasa es una proteína dimérica formada por dos subunidades idénticas. En las bacterias gramnegativas, las enzimas son complejos hexaméricos de subunidades idénticas. Cada subunidad de la enzima en los mamíferos tiene dos dominios distintos: un pequeño dominio flexible en la superficie externa, y un dominio mayor que forma el núcleo de la proteína (figura 13.6). Las dos subunidades se asocian por interacciones entre las cuatro hélices α en cada uno de los dominios grandes, para formar un emparedado de α-hélice. La citrato sintasa sufre un gran cambio de conformación al unirse al oxaloacetato, como se ve en la figura 13.6. El sitio de enlazamiento está en la base de una hendidura profunda entre el dominio pequeño de una subunidad y el dominio grande de la otra. Cuando se enlaza el oxaloacetato, el dominio pequeño gira 20° respecto al dominio

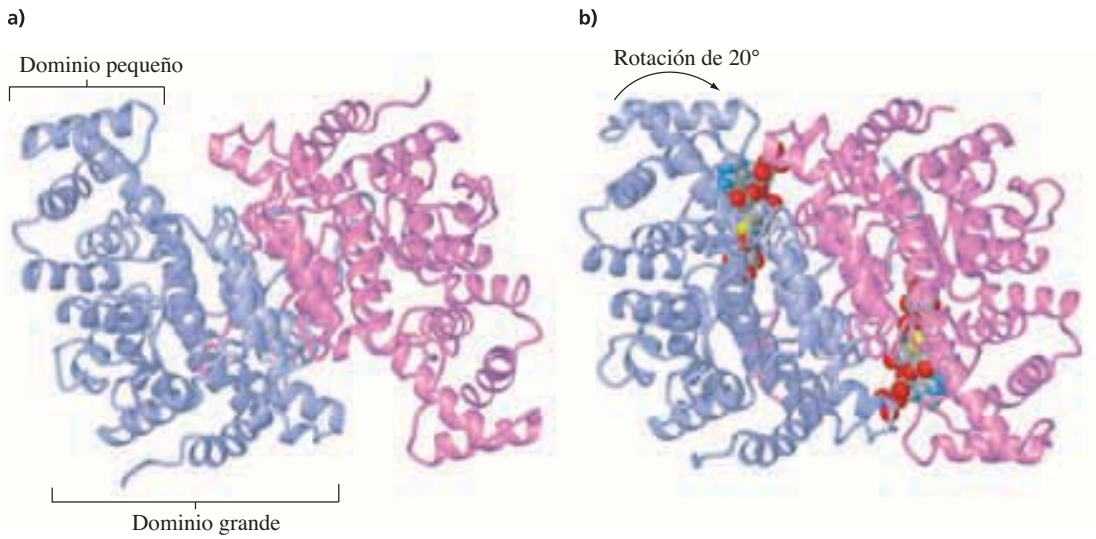


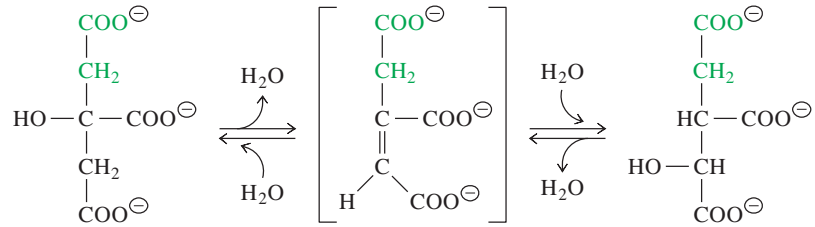
Figura 13.6 ▲
Citrato sintasa de pollo. Las dos subunidades idénticas tienen colores azul y púrpura. Cada una está formada por un dominio pequeño y uno grande. **a)** Conformación abierta. El sitio de enlazamiento del sustrato está en la profunda hendidura entre el dominio pequeño de una unidad y el dominio grande de la otra. [PDB 5CSC]. **b)** Conformación cerrada. El dominio pequeño se ha desplazado en relación con el grande, para cerrar la gran hendidura de enlazamiento que se ve en la conformación abierta. Los análogos del sustrato se muestran como modelos tridimensionales. [PDB 6CSC]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

grande. Este cerramiento forma el sitio de enlazamiento para la acetil-CoA, sitio formado por cadenas laterales de aminoácidos de los dominios grande y pequeño. Cuando se completa la reacción, la coenzima A se libera. Entonces, la enzima regresa a la conformación abierta cuando se libera el citrato.

La estructura de la enzima necesita que el oxaloacetato y la acetil-CoA se unan en forma sucesiva. Eso reduce la probabilidad de enlazar la acetil-CoA en ausencia de oxaloacetato, y la posibilidad de catalizar la hidrólisis del enlace de tioéster en el acetil-CoA en una reacción desperdiciada. Esta reacción secundaria potencial es un peligro muy real, ya que el enlace tioéster de la acetil-CoA está cerca del sitio activo para la hidrólisis del tioéster citril-CoA, y porque la concentración de oxaloacetato puede ser muy baja en relación con la del acetil-CoA.

2. Aconitasa

La aconitasa (nombre sistemático: aconitato hidratasa) cataliza una conversión cercana al equilibrio de citrato a isocitrato. El citrato es un alcohol terciario, y en consecuencia no se puede oxidar en forma directa para formar un cetoácido. La formación de un cetoácido intermedio se requiere para la reacción de descarboxilación oxidativa que sucede en el paso 3 del ciclo del ácido cítrico. El paso que cataliza la aconitasa forma un alcohol secundario, como preparación para el paso 3. El nombre de la enzima se deriva de *cis*-aconitato, un compuesto intermedio unido a la enzima de la reacción. La reacción se efectúa por la eliminación de agua del citrato para formar un doble enlace carbono-carbono. A esto sigue la adición estereoespecífica de agua para formar isocitrato.



(13.9)

La aconitasa es un miembro de una familia de proteínas. La familia comprende diversas versiones mitocondriales y citoplásmicas de la aconitasa, una proteína reguladora sin actividad catalítica y una enzima que interviene en la síntesis de aminoácidos (sección 13.8). En las bacterias se encuentran dos enzimas lejanamente relacionadas, la aconitasa A y la aconitasa B. Todos los miembros de la familia contienen un grupo característico [4 Fe-4 S] de hierro-azufre. En el capítulo 14 se encontrarán muchas enzimas de óxido-reducción con grupos de hierro-azufre. En la mayor parte de esas enzimas de óxido-reducción, los grupos de hierro-azufre participan en el transporte de electrones, pero los miembros de la familia de la aconitasa son excepcionales, porque el papel del grupo hierro-azufre es ayudar en el enlazamiento del citrato. La reacción de la aconitasa es una reacción de isomerización y no una de óxido-reducción.

Nótese que el citrato no es una molécula quiral, porque ninguno de los átomos de carbono está enlazado a cuatro grupos diferentes. Sin embargo, el producto de la reacción, el isocitrato, tiene dos centros quirales en el C2 y el C3. Cada uno de estos átomos de carbono tiene cuatro sustituyentes diferentes, y en cada caso los cuatro grupos se pueden ordenar en dos orientaciones diferentes. Hay cuatro estereoisómeros diferentes del isocitrato, pero sólo se produce uno de ellos en la reacción catalizada por la aconitasa. El nombre formal de este producto es 2*R*,3*S*-isocitrato (figura 13.7), con la nomenclatura *RS* descrita en el Recuadro 3.1. Esta es una de las pocas veces en que esa nomenclatura es útil en bioquímica elemental.

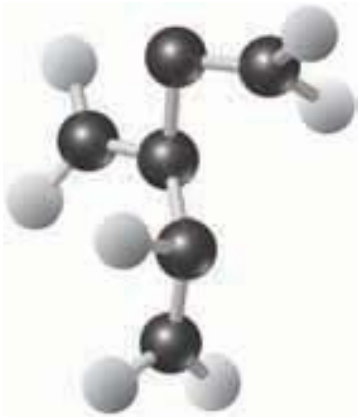


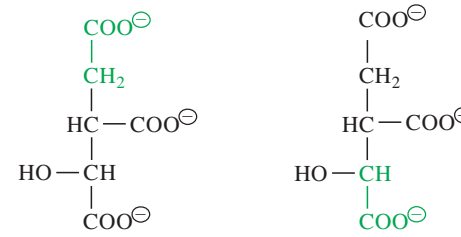
Figura 13.7 ▲
Estructura del 2*R*,3*S*-isocitrato.

RECUADRO 13.2 Fijación de sustratos proquirales a enzimas en tres puntos

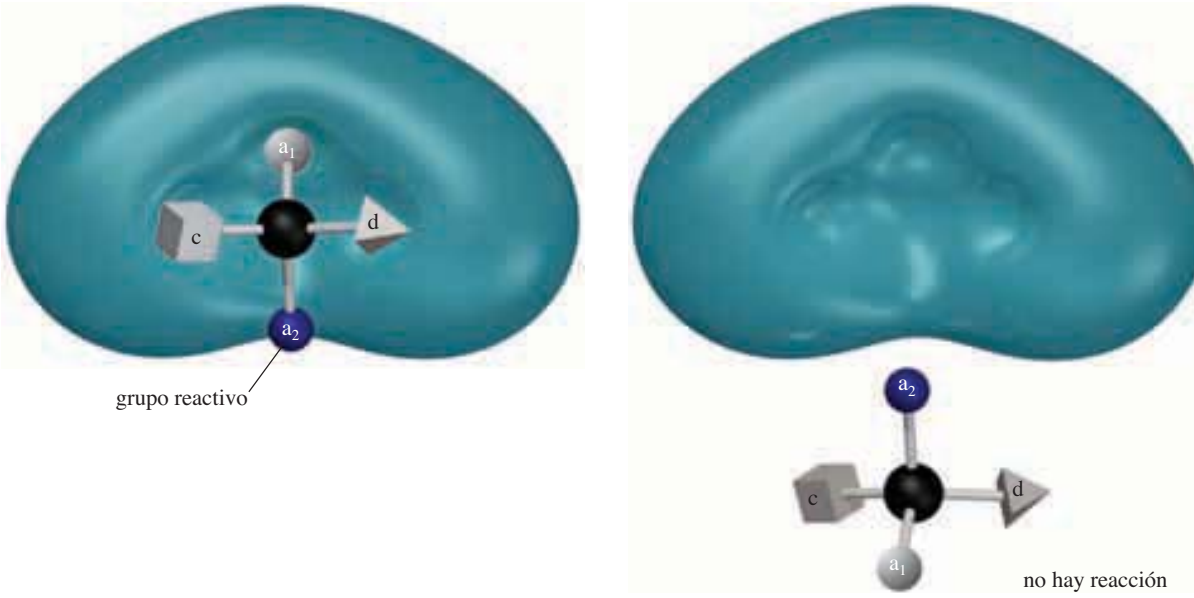
Cuando Krebs propuso por primera vez el ciclo del ácido cítrico, la inclusión de una reacción de citrato a isocitrato era un gran obstáculo para su aceptación, porque unos estudios con marcadores indicaban que las células sólo producen dos formas posibles de 2*R*,3*S*-isocitrato. El "problema" no era que se produjera una molécula quiral a partir de una no quiral; eso se comprende con facilidad. La dificultad estaba en comprender por qué se efectuaba la formación del doble enlace del *cis*-aconitato y después la adición de agua para formar isocitrato, ocurriendo sólo en la mitad que aportaba originalmente el oxaloacetato, y no en el grupo derivado de la acetil-CoA. Cuando se agregó acetato marcado isotópicamente a las células, los átomos de carbono ^{14}C marcados aparecieron en el citrato, como se muestra en gris en la figura 13.5. Como el citrato es una molécula simétrica, se esperaba que los átomos de carbono marcados aparecieran por igual en las dos versiones de isocitrato que se ven en el dibujo de esta página.

En vez de ello, sólo se produjo la forma de la izquierda. En ese tiempo se desconocía la conversión de una molécula no quiral para formar una sola forma de isómero quiral. En 1948, Alexander Ogston demostró cómo se podía distinguir el sitio activo de una enzima entre grupos químicamente equivalentes en la molécula de citrato. Ogston previó el enlazamiento del citrato en una forma que llamó fijación en tres puntos, donde los grupos no idénticos participaban en la interacción entre el sustrato y la enzima (véase la figura de abajo). Una vez que el citrato se enlaza en forma correcta al sitio asimétrico de unión, los dos grupos $-CH_2-COO^{\ominus}$ del citrato tienen orientaciones específicas, por lo que ya no son equivalentes. La formación del doble enlace carbono-carbono sólo puede efectuarse en el grupo que aporta el oxaloacetato.

El citrato es una molécula *proquiral*, porque puede reaccionar en forma asimétrica, a pesar de ser químicamente simétrico. Hoy se conocen varios ejemplos de esas reacciones en las rutas metabólicas.



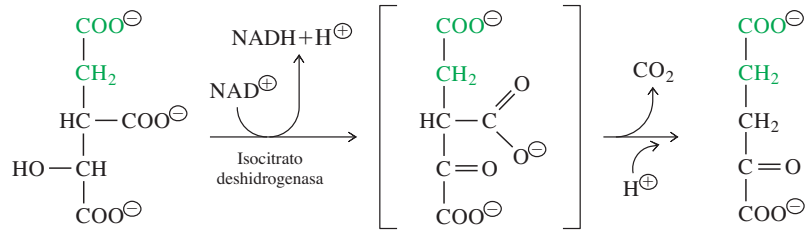
▲ Dos formas de isocitrato. Los átomos de carbono (en gris claro, 9_1) representan al grupo originalmente derivado de la acetil-CoA. La reacción catalizada por la aconitasa debería producir dos formas de isocitrato en cantidades iguales porque el sustrato (citrato) es simétrico. Sólo se produjo la forma de la izquierda.



▲ Enlazamiento del citrato con el sitio activo de la aconitasa. El átomo de carbono central en la molécula de citrato se muestra con cuatro grupos unidos: el grupo hidroxilo (—OH) se representa con un cubo; el grupo carbonilo (—COOH) por una pirámide y los dos grupos $-CH_2-COO^{\ominus}$ se representan como esferas. Los dos grupos $-CH_2-COO^{\ominus}$ son químicamente indistinguibles, pero el que se deriva de la acetil-CoA se representa con la esfera gris claro (a_1), y el que se deriva del oxaloacetato es de color gris oscura (a_2). Una representación de la aconitasa se ve como una molécula asimétrica con sitios de fijación de tres puntos para el grupo hidroxilo, el carbonilo, el carboxilo y uno de los grupos $-CH_2-COO^{\ominus}$. Cuando el citrato se orienta como se muestra a la izquierda, puede unirse a la aconitasa, y la reacción se efectúa en la mitad derivada del oxaloacetato. La otra orientación, que se ve a la derecha, no se puede unir a la enzima, por lo que la reacción no puede efectuarse en el grupo derivado de la acetil-CoA.

3. Isocitrato deshidrogenasa

La isocitrato deshidrogenasa cataliza la descarboxilación oxidativa de isocitrato para formar α-cetoglutarato. Esta reacción es la primera de cuatro de óxido-reducción en el ciclo del ácido cítrico. La reacción se acopla a la reducción de $NAD^{\oplus}$ y sucede en dos pasos, que implican un compuesto intermedio de oxalosuccinato unido a enzima.



(13.10)

En el primer paso, el grupo hidroxilo del isocitrato se oxida por eliminación de dos hidrógenos, para formar un doble enlace —C═O. Esta es una reacción típica de deshidrogenasa. Uno de los hidrógenos (el que está unido al átomo de carbono) es transferido a $NAD^{\oplus}$ como ion hidruro que lleva dos electrones, y el otro (el que está en el grupo —OH se representa como un protón en el primer paso. Es la primera de las reacciones que dan como resultado pérdida de electrones (es decir, la oxidación de un ácido orgánico).

El oxalosuccinato es un cetoácido inestable y es el producto del primer paso en la reacción general catalizada por isocitrato deshidrogenasa. Antes de ser liberado de la enzima, este intermedio sufre descarboxilación y forma α-cetoglutarato en el segundo paso de la reacción. La reacción de descarboxilación se asocia a la liberación de CO_2 y la toma de un protón. La estequiometría general de la reacción es

$$\text{Isocitrato} + NAD^{\oplus} \longrightarrow \alpha\text{-Cetoglutarato} + NADH + CO_2 \quad \textbf{(13.11)}$$

Hay varias versiones de isocitrato deshidrogenasa. Las bacterias contienen tanto una enzima dependiente de $NAD^{\oplus}$ como una enzima dependiente de $NADP^{\oplus}$. Los eucariotas también tienen los dos tipos, pero además las enzimas dependientes de $NADP^{\oplus}$ forman varias subclases. En general, la enzima dependiente de $NAD^{\oplus}$ se localiza en las mitocondrias, y desempeña la función principal en el ciclo del ácido cítrico. Las enzimas dependientes de $NADP^{\oplus}$ se encuentran en el citoplasma, cloroplastos y otros componentes de la membrana. Todas las formas de las enzimas son homólogas por similaridad de secuencia, y comparten un ancestro común con una enzima en la ruta de biosíntesis de leucina (sección 13.9).

La regulación de la isocitrato deshidrogenasa en los procariotas se describe en la sección 13.8.

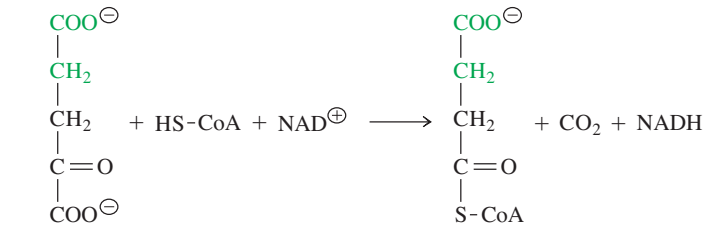
Antes de pasar a la siguiente reacción se hará una pausa para describir el nombre del producto de esta reacción. El nombre α-cetoglutarato se debe al ácido dicarboxílico glutarato, de cinco carbonos ($^{-}OOC—CH_2—CH_2—CH_2—COO^{\ominus}$). El grupo ceto está en el carbono α, o primer carbono junto a uno de los grupos carbonilo. Esta convención de nomenclatura se parece a la conocida al nombrar α-aminoácidos (sección 3.1). Como en el caso de los aminoácidos, el nombre químico correcto, o nombre sistemático, del α-cetoglutarato podría ser 2-cetoglutarato. Sin embargo, el nombre formal en realidad es 2-oxoglutarato, porque según las reglas de nomenclatura IUPAC/IUBMB se debe evitar el término "ceto."

Es perfectamente aceptable llamar a las moléculas orgánicas por sus nombres comunes o triviales, si se conocen bien esos nombres. Por ejemplo, si se regresa al paso 1 del ciclo del ácido cítrico, se puede ver que el nombre sistemático del oxaloacetato es 2-oxosuccinato, porque es derivado del ácido dicarboxílico succinato, de cuatro carbonos. "Oxaloacetato" es el nombre común, bien conocido y aceptado para este compuesto, y sería confuso usar otro nombre. Cuando se llega al nombre correcto del α-cetoglutarato

la situación se complica más, porque α-cetoglutarato es el nombre sistemático antiguo de la molécula que se ve en la ecuación 13.10, y las nuevas reglas establecen que el nombre sistemático debe ser 2-oxoglutarato. El nuevo nombre se populariza cada vez más en las publicaciones científicas. Aquí se seguirá usando el conocido nombre α-cetoglutarato, teniendo en cuenta que se ha vuelto un nombre común aceptable de este compuesto.

4. El complejo α-cetoglutarato deshidrogenasa

La descarboxilación oxidativa del α-cetoglutarato es análoga a la reacción catalizada por la piruvato deshidrogenasa. En ambos casos los reactivos son un α-cetoácido y HS-CoA, y los productos son CO_2 y un compuesto tioéster de alta energía. El paso 4 del ciclo del ácido cítrico está catalizado por α-cetoglutarato deshidrogenasa (llamado también 2-oxoglutarato deshidrogenasa).



α-Cetoglutarato Succinil-CoA **(13.12)**

La α-cetoglutarato deshidrogenasa es un complejo grande que se parece a la piruvato deshidrogenasa, tanto en estructura como en función. Intervienen las mismas coenzimas y el mecanismo de la reacción es igual. Las tres enzimas componentes del complejo de α-cetoglutarato deshidrogenasa son α-cetoglutarato deshidrogenasa (E_1, que contiene TPP), dihidrolipoamida succinil transferasa (E_2 que contiene un brazo oscilante de lipoamida) y dihidrolipoamida deshidrogenasa (E_3, la misma flavoproteína que se encuentra en el complejo de piruvato deshidrogenasa). La reacción general es la segunda de las dos reacciones productoras de CO_2 en el ciclo del ácido cítrico, y la segunda reacción que genera equivalentes reductores. En las cuatro reacciones restantes del ciclo, el grupo succinilo, de cuatro carbonos, de la succinil-CoA se regresa a oxaloacetato.

Las células de eucariotas tienen una sola α-cetoglutarato deshidrogenasa mitocondrial. Las arqueobacterias y algunas otras especies de bacterias no tienen α-cetoglutarato deshidrogenasa. En su lugar, convierten α-cetoglutarato en succinil-CoA usando una enzima totalmente distinta, llamada 2-oxoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa.

5. Succinil-CoA sintetasa

La conversión de succinil-CoA en succinato es catalizada por la succinil-CoA sintetasa, a la que a veces se le llama succinato tiocinasa. En la reacción se acoplan la hidrólisis del enlace tioéster, de alta energía, en la succinil-CoA, y la formación de un nucleósido trifosfato (GTP o ATP). El fosfato inorgánico es uno de los reactivos, y la reacción se efectúa en tres pasos (figura 13.8, página siguiente).

El primer paso genera succinil-fosfato como compuesto intermedio, y libera coenzima A. En el segundo paso se transfiere el grupo fosforilo a una cadena lateral de histidina en el sitio activo de la enzima, para formar una fosfoenzima intermedia estable. En el tercer paso se transfiere el grupo fosforilo a GDP para formar GTP. Esta reacción es el único ejemplo de fosforilación a nivel de sustrato en el ciclo del ácido cítrico. (Recuérdese, de la sección 10.8, que el cambio de energía libre de Gibbs estándar para la hidrólisis del enlace tioéster de la succinil-CoA equivale aproximadamente al de la hidrólisis de ATP.) La estequiometría general de la reacción de la succinil-CoA sintetasa es

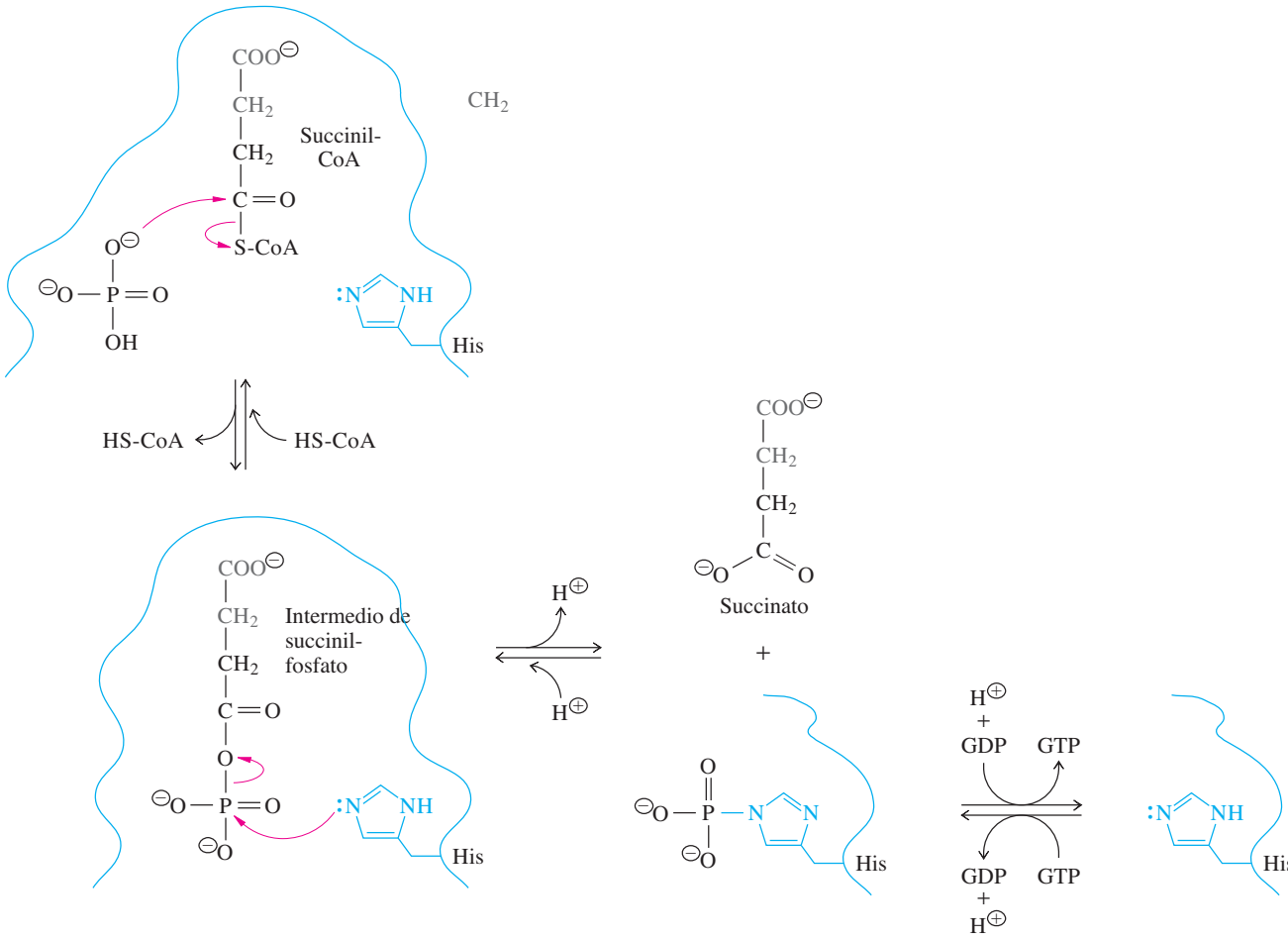


Figura 13.8 ▲
Mecanismo propuesto para la succinil-CoA sintetasa. El fosfato desplaza a la HS-CoA de una molécula de succinil-CoA enlazada, formando el ácido mixto anhídrido succinil-fosfato como intermedio. El grupo fosforilo se transfiere entonces del succinil-fosfato a un residuo de histidina de la enzima, para formar un intermedio relativamente estable de fosfoenzima covalente. Se libera succinato y la fosfoenzima intermedia transfiere su grupo fosforilo al GDP (o al ADP, dependiendo del organismo) y se forma el producto nucleósido trifosfato.

$$\text{Succinil-CoA} + P_i + \text{GDP} \longrightarrow \text{Succinato} + \text{HS-CoA} + \text{GTPC} \qquad \textbf{(13.13)}$$

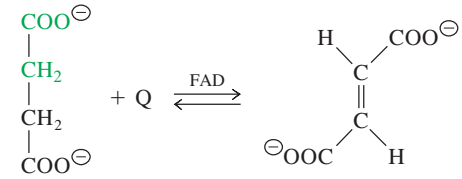
El fosfato inorgánico aporta el grupo fosforilo al GDP, más un oxígeno para formar succinato y un hidrógeno para formar HS-CoA. Nótese que el nombre de la enzima se debe a la reacción contraria, donde se sintetiza succinil-CoA a partir de succinato a expensas de GTP o de ATP. Se llama sintetasa porque en la reacción se combinan dos moléculas y está acoplada a la hidrólisis de un nucleósido trifosfato.

En las células de eucariotas, la succinil-CoA sintetasa está exclusivamente en las mitocondrias. La enzima está formada por dos subunidades α y dos β ($\alpha_2\beta_2$). Las subunidades β contienen el sitio de enlazamiento para el nucleótido. Las versiones bacterianas usan ATP, en tanto que los eucariotas tienen con frecuencia dos versiones de la enzima: una que usa GTP y otra que usa ATP. Son distintas en sus subunidades β. Las versiones dependientes de GTP evolucionaron claramente de las versiones dependientes de ATP. Las arqueobacterias y algunas otras bacterias no tienen succinil-Coa sintetasa. Efectúan una reacción parecida usando una enzima totalmente distinta llamada succinil-CoA:acetoacetato-CoA transferasa.

6. Complejo de succinato deshidrogenasa

La succinato deshidrogenasa cataliza la oxidación de succinato a fumarato, formando un doble enlace carbono-carbono y perdiendo dos protones y dos electrones. Los protones y los electrones pasan a una quinona, que se reduce a QH_2. (El sustrato preferido en casi todos los casos es la ubiquinona, pero algunas bacterias usan menaquinona). El FAD es un cofactor esencial en las enzimas succinato deshidrogenasa que existen en todas las especies.

La estructura de la menaquinona se muestra en la figura 14.21.



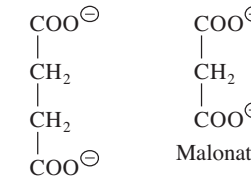
Succinato Fumarato **(13.14)**

El sitio activo de la enzima se forma a partir de dos subunidades diferentes. Una contiene grupos de hierro-azufre, y la otra es una flavoproteína con FAD unido en forma covalente. El dímero de succinato deshidrogenasa está enlazado a dos polipéptidos de membrana, formando un complejo grande. Los componentes de membrana consisten en un citocromo *b*, con su grupo hemo asociado, y un sitio de enlazamiento con quinona. Los cofactores de transporte de electrones participan en la transferencia de electrones del succinato al FAD y a varios grupos de hierro-azufre al hemo y a la quinona. Recuérdese que el $FADH_2$ en la subunidad E_3 de la piruvato deshidrogenasa se vuelve a oxidar por el $NAD^{\oplus}$ para completar el ciclo catalítico de esa enzima. En la reacción de succinato deshidrogenasa, Q vuelve a oxidar a $FADH_2$ para regenerar FAD. Era muy común mostrar al $FADH_2$ como producto redox de esta reacción, pero ya que el FAD está enlazado a la enzima en forma covalente, el ciclo catalítico no se completa sino hasta que se vuelve a oxidar el $FADH_2$, y se libera el producto móvil, QH_2.

En el capítulo 14 se describirá de nuevo la transferencia de equivalentes reductores a Q, en la cual se verá el papel del complejo de succinato deshidrogenasa en el transporte de electrones asociado a la membrana.

El complejo de succinato deshidrogenasa es parte del sistema de transporte de electrones que está en la membrana plasmática de los procariotas, y en la membrana mitocondrial interna en las células eucarióticas. Se describirá esta enzima con más detalle en el próximo capítulo (sección 14.6) y se examinará su estructura (figura 14.8). En las bacterias, la mayor parte del complejo enzimático se encuentra en el citoplasma, donde se puede enlazar a succinato y liberar fumarato como parte del ciclo del ácido cítrico. En las mitocondrias, el sitio activo está en el lado de la matriz de la membrana, donde están las demás enzimas del ciclo del ácido cítrico.

El sustrato análogo malonato (figura 13.9) es un inhibidor competitivo del complejo succinato deshidrogenasa. El malonato, igual que el succinato, es un dicarboxilato que se enlaza a residuos aminoácidos catiónicos en el sitio activo del complejo succinato deshidrogenasa. Sin embargo, el malonato no puede efectuar la oxidación porque carece del grupo $—CH_2—CH_2—$ necesario para la deshidrogenación. En experimentos efectuados con mitocondrias aisladas u homogenados de células, la presencia de malonato hizo que se acumularan succinato, α-cetoglutarato y citrato. Tales experimentos proporcionaron alguna evidencia original en relación con la secuencia de las reacciones en el ciclo del ácido cítrico.

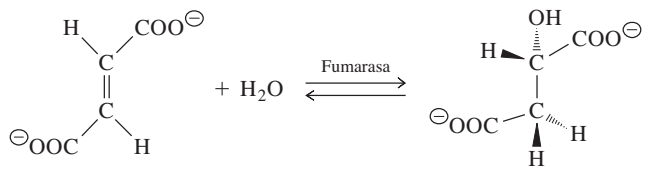


Succinato Malonato

Figura 13.9 ▲
Succinato y malonato. El malonato se une al sitio de enlazamiento del sustrato del complejo de succinato deshidrogenasa, pero no reacciona.

7. Fumarasa'

La fumarasa (nombre sistemático: fumarato hidratasa) cataliza la conversión, cercana al equilibrio, de fumarato a malato mediante la adición *trans* estereoespecífica de agua al doble enlace del fumarato.



Fumarato L-Malato **(13.15)**

El fumarato, como el citrato, es una molécula proquiral. Cuando se ubica el fumarato en el sitio activo de la fumarasa, puede ser atacado el doble enlace del sustrato sólo desde una dirección. El producto es el estereoisómero L del hidroxiácido malato.

Hay dos fumarasas no relacionadas que pueden catalizar la misma reacción. La enzima de clase I se encuentra en la mayor parte de las bacterias. La enzima de clase II está presente en algunas bacterias y en todos los eucariotas. Algunas bacterias, como *E. coli*, tienen ambas formas de la enzima. Una forma es activa en el ciclo normal del ácido cítrico y la otra suele catalizar la reacción inversa, para convertir malato en fumarato.

El origen evolutivo de la fumarasa, y la importancia de la reacción contraria en las bacterias, se describen en la sección 13.8.

8. Malato deshidrogenasa

El último paso en el ciclo del ácido cítrico es la oxidación del malato para regenerar oxaloacetato, con la formación de una molécula de NADH.

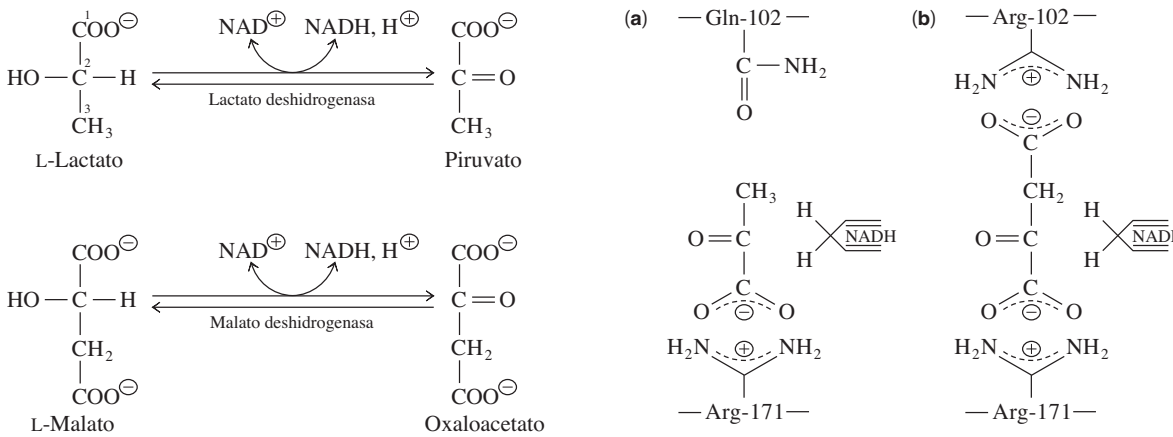
(13.16)

En la figura 4.22 se comparan las estructuras de la malato deshidrogenasa y lactato deshidrogenasa.

Esta reacción es catalizada por malato deshidrogenasa dependiente de NAD⊕. La interconversión, cercana al equilibrio, del α-hidroxiácido L-malato y el cetoácido oxaloacetato es análoga a la reacción reversible catalizada por la lactato deshidrogenasa (secciones 7.4 y 11.3B). Esto no es de sorprender, ya que la lactato deshidrogenasa y la malato deshidrogenasa comparten un ancestro común.

RECUADRO 13.3 Conversión de una enzima en otra

A pesar de tener poca identidad de secuencias de aminoácido, la lactato deshidrogenasa y la malato deshidrogenasa se relacionan mucho entre sí en su estructura tridimensional, y evolucionaron de un ancestro común. Estas enzimas catalizan la oxidación reversible de 2-hidroxiácidos que sólo difieren en un carbono (el malato tiene un carboxilato adicional unido al C-3 del lactato). Ambas enzimas son muy específicas para sus propios sustratos. Sin embargo, la mutación específica de sitio, de un solo residuo de aminoácido de la lactato deshidrogenasa de *Bacillus stearothermophilus* cambia esta enzima a una malato deshidrogenasa (véase la figura al pie). La conversión de Gln-102 en Arg-102 invierte por completo la especificidad de la deshidrogenasa. La cadena lateral, con carga positiva de la arginina, forma un par de iones con el grupo 3-carboxilato del malato, y la enzima mutante se desactiva con el lactato.



▲ Orientación de la molécula de sustrato en el sitio activo de la lactato deshidrogenasa de *Bacillus stearothermophilus*. **a)** El sustrato piruvato, de tres carbonos, unido a la enzima nativa. **b)** El sustrato oxaloacetato, de cuatro carbonos, unido al mutante Gln-a-Arg (posición 102).

13.4 Las coenzimas reducidas pueden generar la producción de ATP

En la reacción neta del ciclo del ácido cítrico se producen tres moléculas de NADH, una molécula de QH_2 y una molécula de GTP o ATP por cada molécula de acetil-CoA que entra a la ruta.

$$\text{Acetil-CoA} + 3\ \text{NAD}^{\oplus} + \text{Q} + \text{GDP (o ADP)} + \text{P}_\text{i} + 2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow$$

$$\text{HS-CoA} + 3\ \text{NADH} + \text{QH}_2 + \text{GTP (o ATP)} + 2\ \text{CO}_2 + 2\text{H}^{\oplus} \qquad \textbf{(13.17)}$$

Como se mencionó antes, se pueden oxidar el NADH y la QH_2 mediante la cadena de transporte de electrones asociada a membrana, que está acoplada a la producción de ATP. Como se verá al examinar estas reacciones en el capítulo 14, se generan aproximadamente 2.5 moléculas de ATP por cada molécula de NADH que se oxida a $NAD^{\oplus}$, y hasta 1.5 moléculas de ATP se producen por cada molécula de QH_2 que se oxida a Q. La oxidación completa de una molécula de acetil-CoA en el ciclo del ácido cítrico y las reacciones posteriores se asocia, por consiguiente, a la producción de unas 10 moléculas de ATP.

Reacción	Productor de energía	Equivalentes de ATP
Isocitrato deshidrogenasa	NADH	2.5
Complejo de α-cetoglutarato deshidrogenasa	NADH	2.5
Succinil-CoA sintetasa	GTP o ATP	1.0
Complejo de succinato deshidrogenasa	QH_2	1.5
Malato deshidrogenasa	NADH	2.5
Total		10.0

(13.18)

El ciclo del ácido cítrico es la etapa final en el catabolismo de muchos de los principales nutrientes. Es la ruta para la oxidación de todas las moléculas de acetil-CoA que se producen por la degradación de carbohidratos, lípidos y aminoácidos. Luego de haber explicado la glucólisis en el capítulo 11, se presentarán las cuentas completas del ATP que se produce en la degradación de una molécula de glucosa.

Recuérdese que en la glucólisis se convierte la glucosa en dos moléculas de piruvato, con una ganancia neta de dos moléculas de ATP. Hay dos moléculas de NADH producidas en la reacción catalizada por la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. Eso corresponde a un rendimiento combinado de 7 equivalentes de ATP de la glucólisis. La conversión de las dos moléculas de piruvato en acetil-CoA por el complejo de piruvato deshidrogenasa produce dos moléculas de NADH, que corresponden aproximadamente a cinco moléculas más de ATP. Cuando se combinan con los equivalentes de ATP del ciclo del ácido cítrico, por oxidación de dos moléculas de acetil-CoA, el rendimiento total es 32 moléculas de ATP por molécula de glucosa (figura 13.10, página siguiente).

En las bacterias, las dos moléculas de NADH producidas por glucólisis en el citosol se pueden volver a oxidar en forma directa por el sistema de transporte de electrones asociado a membrana en la membrana plasmática. Así, el rendimiento teórico máximo de la oxidación completa de la glucosa (32 equivalentes de ATP) se alcanza en las células bacterianas.

En las células de eucariotas, la glucólisis produce NADH en el citosol, pero el complejo de transporte de electrones asociado a membrana está en las membranas de las mitocondrias. Los equivalentes reductores del NADH citosólico se pueden transportar al interior de la mitocondria con mecanismos de vaivén, dos de los cuales se describirán en la sección 14.12 con detalle. Como la membrana mitocondrial interna es impermeable al

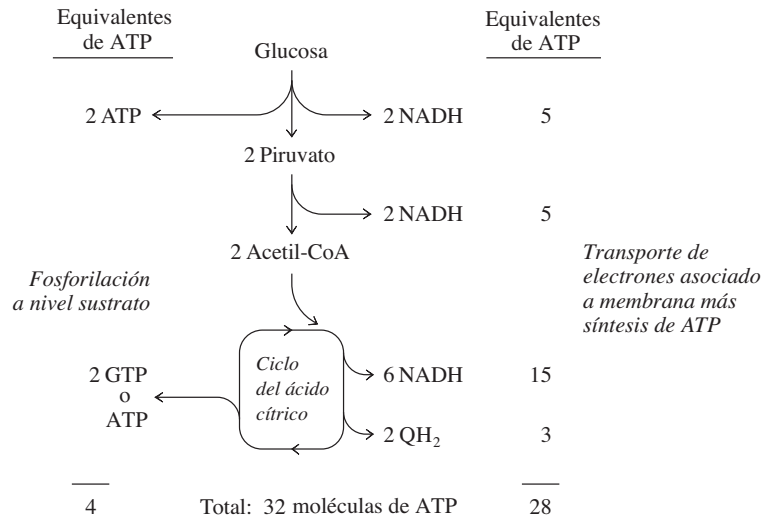


Figura 13.10 ▶
Producción de ATP en el catabolismo de una molécula de glucosa por glucólisis, ciclo del ácido cítrico y reoxidación de NADH y QH_2. La oxidación completa de la glucosa lleva a la formación de unas 32 moléculas de ATP.

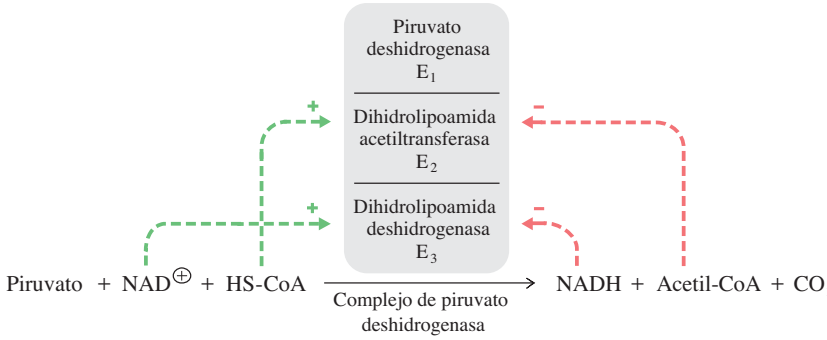
NADH, los equivalentes reductores deben ser transportados al interior de la mitocondria en forma de metabolitos reducidos que se oxidan dentro de la mitocondria. Los metabolitos oxidados regresan al citosol para completar las transferencias cíclicas. Ambas transferencias regeneran $NAD^{\oplus}$ en el citosol, para que pueda continuar la glucólisis. Con mucho, el principal transportador de vaivén o lanzadera que usan las células es el de malato-aspartato. Cuando está funcionando este sistema, un NADH puede producir 2.5 equivalentes de ATP. Cuando entra NADH a la mitocondria por un mecanismo alterno, la lanzadera de fosfato de glicerol, cada NADH rinde alrededor de 1.5 ATP, y la producción total es de aproximadamente 30 moléculas de ATP, por molécula de glucosa. Así, el rendimiento de la oxidación completa de la glucosa en las células eucarióticas suele ser menor que el máximo teórico.

13.5 Regulación del ciclo del ácido cítrico

Como el ciclo del ácido cítrico ocupa un lugar central en el metabolismo celular, resulta sorprendente encontrar que la ruta está estrictamente controlada. La regulación es mediada por moduladores alostéricos, y por modificación covalente de las enzimas del ácido cítrico. El flujo a través de la ruta se controla también por el suministro de acetil-CoA.

Según se hizo notar antes, la acetil-CoA procede de varias fuentes, entre las que están rutas para degradación de carbohidratos, lípidos y aminoácidos. La actividad del complejo de piruvato deshidrogenasa controla el suministro de la acetil-CoA producida a partir del piruvato, y en consecuencia de la degradación de carbohidratos. En general, los sustratos del complejo piruvato deshidrogenasa activan el complejo, y los productos lo inhiben. En la mayoría de las especies, las actividades de los componentes E_2 y E_3 del complejo de piruvato deshidrogenasa (dihidrolipoamida acetiltransferasa y dihidrolipoamida deshidrogenasa, respectivamente) están controladas por efectos simples de acción de masas cuando se acumulan sus productos. La actividad de la acetiltransferasa (E_2) se inhibe cuando la concentración de acetil-CoA es alta, mientras que la deshidrogenasa (E_3) es inhibida mediante una relación grande de NADH/$NAD^{\oplus}$ (figura 13.11). En general, es probable que los inhibidores existan en altas concentraciones cuando los recursos energéticos son abundantes, y que predominen los activadores cuando los recursos energéticos escasean.

Los complejos de piruvato deshidrogenasa en los mamíferos (pero no en los procariotas) son regulados además por modificación covalente. Una proteína cinasa y una proteína fosfatasa se asocian al complejo multienzimático en los mamíferos. La piruvato deshidrogenasa cinasa (PDK) cataliza la fosforilación de E_1 y con ello la desactiva. La piruvato deshidrogenasa fosfatasa (PDP) cataliza la desfosforilación y la activación de E_1 (figura 13.12). El control de la actividad de E_1 controla la velocidad de reacción de todo el complejo.



◀Figura 13.11
Regulación del complejo de piruvato deshidrogenasa. La acumulación de los productos, acetil-CoA y NADH hace bajar el flujo por las reacciones reversibles catalizadas por E_2 y E_3.

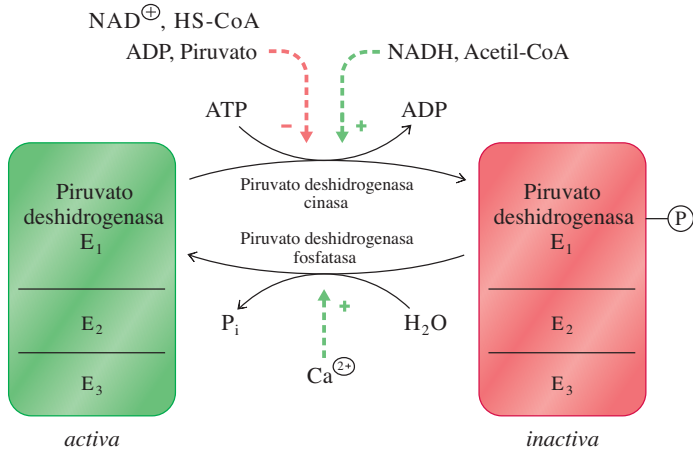
También se regulan las actividades de la piruvato deshidrogenasa cinasa y la piruvato deshidrogenasa fosfatasa. El NADH y la acetil-CoA, productos de la oxidación de piruvato, activan alostéricamente a la cinasa. La acumulación de NADH y acetil-CoA señala que hay disponibilidad de energía y conduce a un aumento de fosforilación de la subunidad de piruvato deshidrogenasa, y la inhibición de oxidación posterior del piruvato. Al revés, el piruvato, $NAD^{\oplus}$, HS-CoA y ADP inhiben la cinasa, y causan la activación de la subunidad de piruvato deshidrogenasa. El Ca^{2+} también regula el estado de fosforilación de E_1. Las altas concentraciones de Ca^{2+} causan desfosforilación de la subunidad E_1 y aumento del flujo por el complejo de piruvato deshidrogenasa. Ciertas hormonas controlan la concentración de Ca^{2+} en las mitocondrias.

En el ciclo del ácido cítrico se regulan tres reacciones. Son las reacciones catalizadas por la citrato sintasa, la isocitrato deshidrogenasa y el complejo de α-cetoglutarato deshidrogenasa.

La citrato sintasa cataliza la primera reacción del ciclo del ácido cítrico. Este parecería ser un punto adecuado de control para regular todo el ciclo. El ATP inhibe a la enzima *in vitro*, pero no es probable que haya cambios importantes en la concentración de ATP *in vivo*; por consiguiente, puede ser que el ATP no sea un regulador fisiológico. Algunas citrato sintasas bacterianas son activadas por α-cetoglutarato e inhibidas por NADH.

La isocitrato deshidrogenasa de los mamíferos es activada alostéricamente por Ca^{2+} y ADP, y el NADH la inhibe. En los mamíferos, la enzima no está sujeta a modificación covalente. Sin embargo, en las bacterias, la fosforilación regula a la isocitrato deshidrogenasa. En la sección 13.7 se describirá esto con más detalle.

Aunque el complejo α-cetoglutarato deshidrogenasa se parece al de piruvato deshidrogenasa, las enzimas tienen funciones reguladoras muy distintas. La cinasa o la fosfatasa no se relacionan con el complejo de α-cetoglutarato deshidrogenasa. En vez



◀Figura 13.12
Regulación del complejo piruvato deshidrogenasa en los mamíferos por fosforilación del componente E_1. La cinasa y la fosfatasa reguladoras son componentes del complejo en los mamíferos. La cinasa se activa por NADH y acetil-CoA, productos de la reacción catalizada por el complejo de piruvato deshidrogenasa, y se inhibe por ADP y los sustratos piruvato, $NAD^{\oplus}$, y HS-CoA. La desfosforilación se estimula con concentraciones elevadas de Ca^{2+}.

de ello, los iones calcio se unen a E_1 del complejo y bajan la K_m de la enzima para α-cetoglutarato, y con ello aumentan la velocidad de formación de la succinil-CoA. El NADH y la succinil-CoA son inhibidores *in vitro* del complejo α-cetoglutarato, pero no se ha establecido que tengan un papel regulador importante en las células vivas.

13.6 El ciclo del ácido cítrico no siempre es un "ciclo"

El ciclo del ácido cítrico no es exclusivamente una ruta catabólica para la oxidación de la acetil-CoA. También tiene un papel central en el metabolismo, en la intersección de varias rutas. Algunos compuestos intermedios del ciclo del ácido cítrico son importantes precursores metabólicos en rutas de biosíntesis, y algunas rutas catabólicas producen compuestos intermedios del ciclo del ácido cítrico.

Como se ve en la figura 13.13, el citrato, α-cetoglutarato, succinil-CoA y oxaloacetato llevan a rutas de biosíntesis. El citrato es parte de una ruta para la formación de ácidos grasos y esteroides. Se divide para formar acetil-CoA, el precursor de los lípidos. En los eucariotas esta reacción se efectúa en el citosol, y debe transportarse allí el citrato desde las mitocondrias para efectuar la biosíntesis de ácidos grasos. Uno de los principales destinos del α-cetoglutarato es su conversión reversible en glutamato, que entonces puede incorporarse a proteínas y usarse para sintetizar otros aminoácidos o nucleótidos. En el capítulo 17 se verá que las reservas de α-cetoglutarato son importantes en el metabolismo del nitrógeno. La succinil-CoA puede condensarse con la glicina

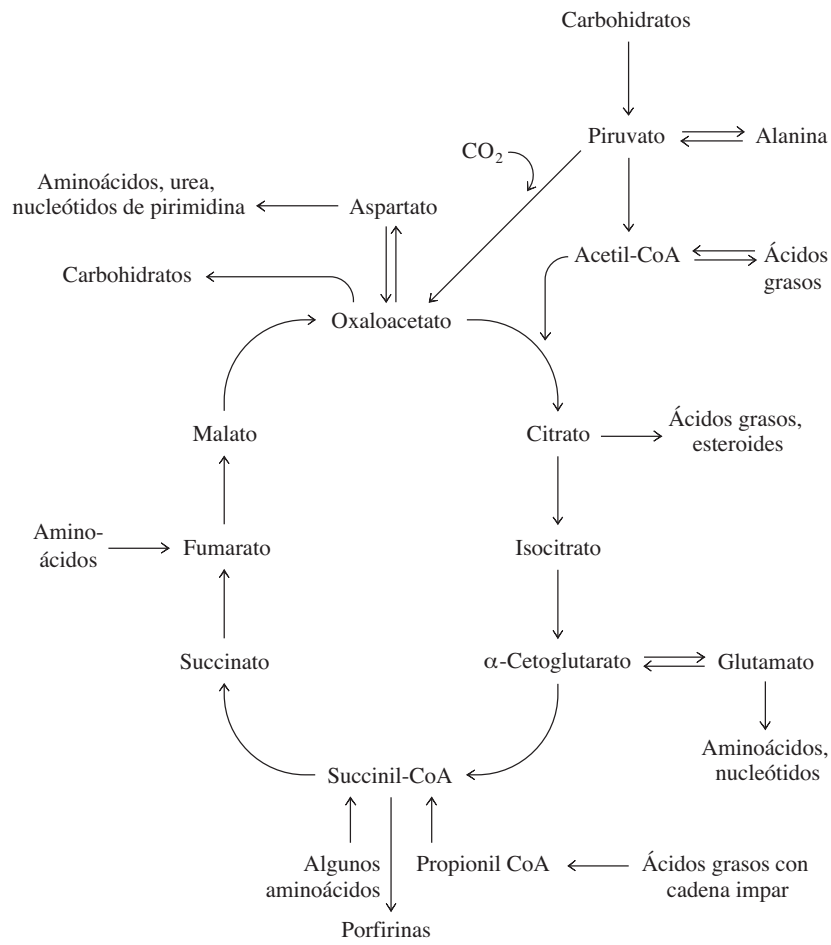


Figura 13.13 ▶
Rutas que conducen al ciclo del ácido cítrico y salen de éste. Los compuestos intermedios en el ciclo del ácido cítrico son precursores de carbohidratos, lípidos y aminoácidos, así como de nucleótidos y porfirinas. Las reacciones que entran al ciclo reabastecen la reserva de compuestos intermedios en el ciclo.

para iniciar la biosíntesis de porfirinas, como en los grupos hemo de los citocromos. Según se vio en el capítulo 12, el oxaloacetato es un precursor de los carbohidratos que se forman por gluconeogénesis. También, el oxaloacetato se interconvierte con el aspartato, que se puede usar en la síntesis de urea, aminoácidos y nucleótidos de pirimidina.

Cuando el ciclo del ácido cítrico funciona como catalizador de varios pasos, sólo se necesitan pequeñas cantidades de catalizador para convertir grandes cantidades de sustratos en productos. Por consiguiente, la velocidad a la que el ciclo del ácido cítrico metaboliza a la acetil-CoA es sensible en extremo a cambios en la concentración de sus productos intermedios. Los metabolitos que se eliminan porque entran a rutas de biosíntesis deben reabastecerse mediante reacciones **anapleróticas** (de "llenado", en griego). Como la ruta es cíclica, el reabastecimiento de cualquiera de sus compuestos intermedios da como resultado mayor concentración de todos los productos intermedios.

La producción de oxaloacetato por piruvato carboxilasa es una reacción regulada importante de rellenado.

$$\text{Piruvato} + CO_2 + \text{ATP} + H_2O \longrightarrow \text{Oxaloacetato} + \text{ADP} + P_i \qquad \textbf{(13.19)}$$

Esta reacción también es parte de la ruta de la gluconeogénesis (sección 12.1A). La acetil-CoA activa alostéricamente a la piruvato carboxilasa. La acumulación de acetil-CoA indica que hay baja concentración de oxaloacetato, y que se necesitan más compuestos intermedios en el ciclo del ácido cítrico. La activación de la piruvato carboxilasa suministra oxaloacetato para el ciclo.

Muchas especies usan diversas reacciones para mantener un delicado balance entre la entrada y la salida de los intermedios en el ciclo del ácido cítrico. Por ejemplo, muchas plantas y algunas bacterias suministran oxaloacetato al ciclo del ácido cítrico a través de una reacción catalizada por fosfoenolpiruvato carboxilasa.

$$\text{Fosfoenolpiruvato} + NAD_3^{\ominus} \rightleftharpoons \text{Oxaloacetato} + P_i \qquad \textbf{(13.20)}$$

Las rutas de degradación de algunos aminoácidos y ácidos grasos pueden aportar succinil-CoA al ciclo del ácido cítrico. La interconversión de oxaloacetato y aspartato, y de α-cetoglutarato y glutamato, pueden suministrar o eliminar compuestos intermedios del ciclo.

La interrelación de todas estas reacciones, la entrada de acetil-CoA a partir de glucólisis y otras fuentes, la entrada de compuestos intermedios de rutas catabólicas y las reacciones anapleróticas, así como la salida de los compuestos intermedios hacia rutas anabólicas, indican que no siempre el ciclo del ácido cítrico funciona como un ciclo simple, dedicado a oxidar acetil-CoA. De hecho, la mayor parte de las bacterias no tiene todas las enzimas clásicas del ciclo del ácido cítrico. En estas especies, las enzimas disponibles se usan principalmente en rutas de biosíntesis, donde los compuestos intermedios se transforman en precursores para síntesis de aminoácidos y porfirinas (sección 13.8).

13.7 La ruta del glioxilato

La ruta del glioxilato es una vía que se salta algunas de las reacciones del ciclo del ácido cítrico. El nombre de la ruta se debe a la molécula de glioxilato de dos carbonos, compuesto intermedio esencial en esa ruta. Sólo hay dos reacciones. En la primera, un ácido tricarboxílico de seis carbonos (isocitrato) se parte en una molécula de dos carbonos (glioxilato) y un ácido dicarboxílico de cuatro carbonos (succinato). Esta reacción es catalizada por isocitrato liasa (figura 13.14). En la segunda reacción, la molécula de glioxilato de dos carbonos se combina con una molécula de acetil-CoA, de dos carbonos, para formar un ácido dicarboxílico de cuatro carbonos (malato). La enzima para la segunda reacción es malato sintasa.

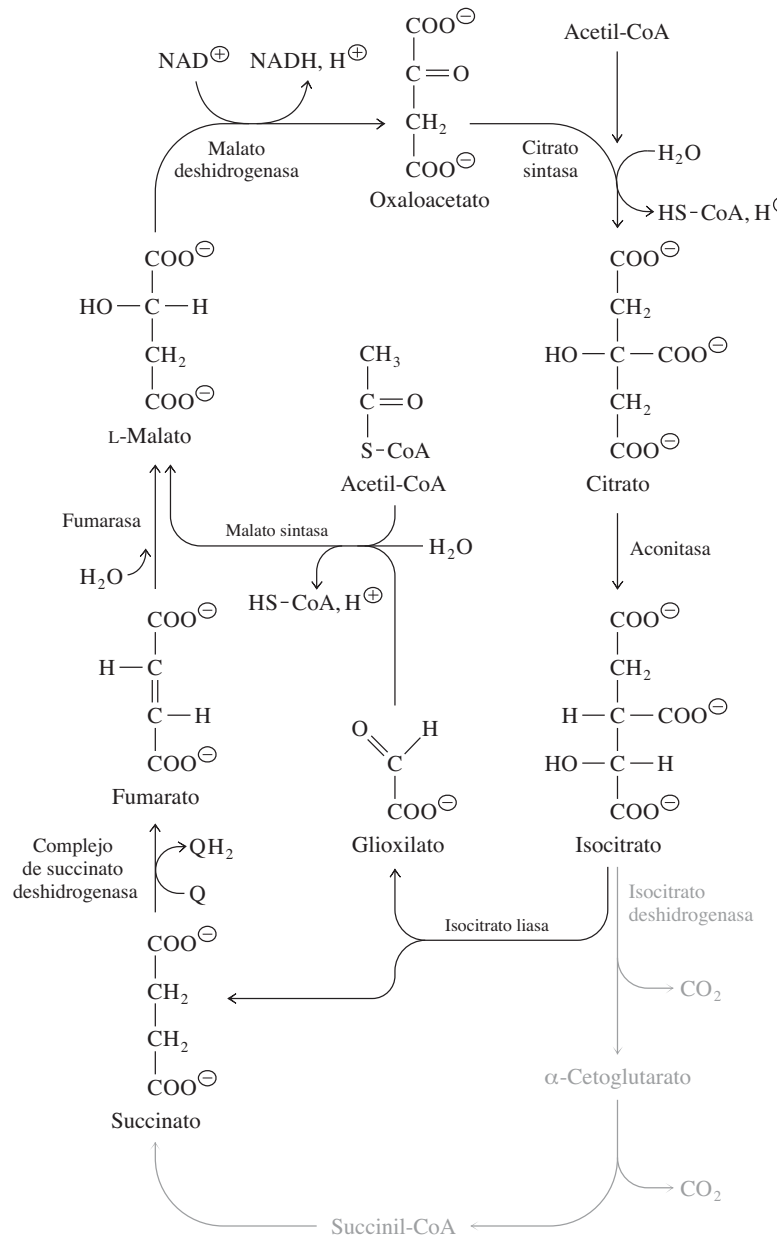


Figura 13.14 ▶
Ruta del glioxilato. La isocitrato liasa y la malato sintasa son las dos enzimas de la ruta. Cuando la ruta funciona, los átomos de carbono del acetilo, en la acetil-CoA, se convierten en malato, y no se oxidan a CO_2. El malato se puede convertir en oxaloacetato, precursor en la gluconeogénesis. El succinato producido en la escisión del isocitrato se oxida a oxaloacetato para sustituir el compuesto de cuatro carbonos consumido en la síntesis de la glucosa.

La ruta del glioxilato fue descubierta en las bacterias. Después se encontró en las plantas, y más adelante, en los hongos, los protistas y algunos animales. Con frecuencia, a esa ruta se le llama el desvío del glioxilato o el ciclo del glioxilato. La ruta del glioxilato proporciona una alternativa anabólica al metabolismo de la acetil-CoA, que lleva a la formación de glucosa a partir de la acetil-CoA por vía de compuestos con cuatro carbonos. Las células que contienen las enzimas de la ruta del glioxilato pueden sintetizar todos los carbohidratos que necesitan a partir de cualquier sustrato que sea precursor del acetil-CoA. Por ejemplo, las levaduras pueden crecer en etanol, porque las células de levadura pueden oxidar etanol y formar acetil-CoA, el que se puede metabolizar a través de la ruta del glioxilato para formar malato. De modo semejante, muchas bacterias usan la ruta del glioxilato para sostener su crecimiento en acetato, que se puede incorporar a la acetil-CoA en una reacción catalizada por la acetil-CoA sintetasa.

$$H_3C-COO^{\ominus} + HS\text{-}CoA \xrightarrow[\text{Acetil-CoA sintetasa}]{\text{ATP} \rightarrow \text{AMP, PP}_i} H_3C-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-S\text{-}CoA \qquad \textbf{(13.21)}$$

Acetato — Acetil-CoA

La ruta del glioxilato es una vía fundamental en bacterias, protistas, hongos y plantas. Tiene actividad especial en las semillas de plantas oleaginosas. En ellas, los aceites (triacilgliceroles) almacenados en las semillas se convierten en carbohidratos que sostienen a la planta durante la germinación. En contraste, en los mamíferos no existen genes para las dos enzimas de la ruta. En consecuencia, en los humanos la acetil-CoA no sirve como precursor para la formación neta de piruvato u oxaloacetato; por consiguiente, la acetil-CoA no es una fuente de carbono para la producción neta de glucosa. (Los átomos de carbono en la acetil-CoA se incorporan al oxaloacetato por las reacciones del ciclo del ácido cítrico, pero por cada dos átomos de carbono que se incorporan, otros dos átomos de carbono se liberan como CO_2).

La ruta del glioxilato se puede considerar como una desviación dentro del ciclo del ácido cítrico, como se muestra en la figura 13.14. Las dos reacciones proporcionan una desviación sobre las reacciones productoras de CO_2 en el ciclo del ácido cítrico. No se liberan átomos de carbono del grupo acetilo del acetil-CoA en forma de CO_2 durante el funcionamiento de la desviación del glioxilato, y la formación neta de una molécula con cuatro carbonos a partir de dos moléculas de acetil-CoA suministra un precursor que se puede convertir en glucosa mediante la gluconeogénesis. El succinato se oxida a malato y a oxaloacetato mediante el ciclo del ácido cítrico, para mantener las cantidades catalíticas de productos intermedios en el ciclo del ácido cítrico. El lector puede imaginar que la desviación del glioxilato es parte de un ciclo que incluye la parte superior del ciclo del ácido cítrico. En este caso, en la reacción neta se incluye la formación de oxaloacetato para la gluconeogénesis y la oxidación cíclica del succinato. Se consumen dos moléculas de acetil-CoA.

$$2\ \text{Acetil-CoA} + 2\ NAD^{\oplus} + Q + 3\ H_2O \longrightarrow$$
$$\text{Oxaloacetato} + 2\ \text{HS-CoA} + 2\ \text{NADH} + QH_2 + 4\ H^{\oplus} \qquad \textbf{(13.22)}$$

En los eucariotas, la operación del ciclo del glioxilato requiere la transferencia de metabolitos entre las mitocondrias, donde están las enzimas del ciclo del ácido cítrico, y el citosol, donde se encuentran la isocitrato liasa y la malato sintasa. Así, la ruta real es más complicada que el diagrama de la figura 13.14. En las plantas, las enzimas para la ruta del glioxilato están en un organelo cubierto con una membrana especial, llamado glioxisoma. Los glioxisomas contienen algunas versiones especiales de las enzimas del ciclo del ácido cítrico, pero todavía hay metabolitos que deben transferirse entre los compartimentos para que la ruta funcione como un ciclo.

En las bacterias, la ruta del glioxilato se usa con frecuencia para reabastecer los metabolitos del ciclo del ácido cítrico, que salen hacia varias rutas de biosíntesis. Como todas las reacciones se efectúan en el citosol en las bacterias, es importante regular el flujo de los metabolitos. La enzima reguladora clave es la isocitrato deshidrogenasa. Su actividad se regula por modificación covalente. La fosforilación de un residuo de serina, catalizada por cinasa, elimina la actividad de la isocitrato deshidrogenasa. En la forma desfosforilada de la enzima, el residuo de serina forma un puente de hidrógeno con un grupo carboxilato del isocitrato. La fosforilación inhibe la actividad enzimática, porque causa repulsión electrostática del sustrato, y no porque ocasione un cambio de conformación de R a T (figura 13.15). La misma molécula de proteína que contiene la actividad de cinasa también tiene un dominio separado con actividad de fosfatasa, que cataliza la hidrólisis de un residuo de fosfoserina que reactiva la isocitrato deshidrogenasa.

Las actividades de cinasa y fosfatasa se regulan en forma recíproca; isocitrato, oxaloacetato, piruvato y los productos intermedios glucolíticos, 3-fosfoglicerato y fosfoenolpiruvato, activan alostéricamente a la fosfatasa e inhiben a la cinasa (figura 13.16). Así, cuando las concentraciones de productos intermedios glucolíticos y del ciclo del ácido cítrico en *E. coli* son altas, la isocitrato deshidrogenasa entra en acción. Cuando la fosforilación anula la actividad de la isocitrato deshidrogenasa, el isocitrato es desviado a la ruta del glioxilato.

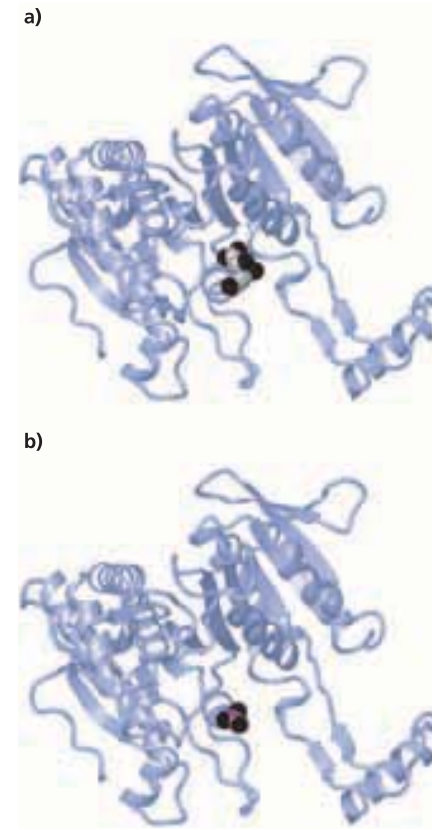


Figura 13.15 ▲
Formas fosforilada y desfosforilada de isocitrato deshidrogenasa de *E. coli*. **a)** La enzima desfosforilada está activa; el isocitrato se une al sitio activo. [PDB5ICD]. **b)** La enzima fosforilada es inactiva, porque el grupo fosforilo con carga negativa (esferas negras) repele electrostáticamente al sustrato y evita que se enlace. [PDB4ICD].

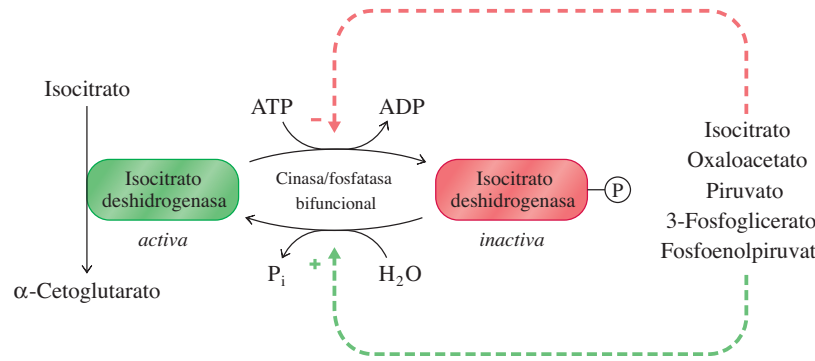


Figura 13.16 ▶
Regulación de isocitrato deshidrogenasa de *E. coli* mediante modificación covalente. Una enzima bifuncional cataliza la fosforilación y desfosforilación de la isocitrato deshidrogenasa. Las dos actividades de la enzima bifuncional se regulan en forma recíproca y alostérica por compuestos intermedios en la glucólisis y en el ciclo del ácido cítrico.

13.8 Evolución del ciclo del ácido cítrico

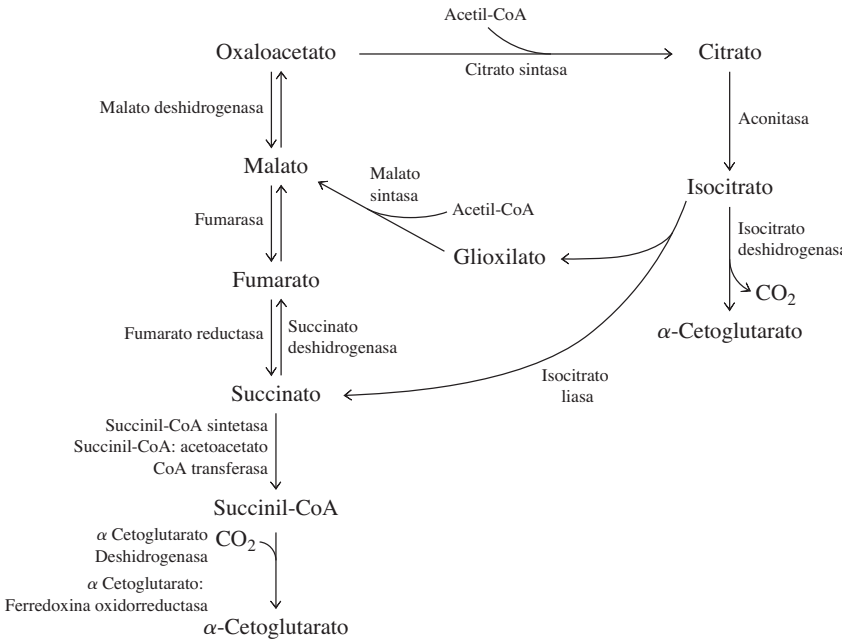
Las reacciones del ciclo del ácido cítrico se descubrieron en los mamíferos, y muchas de las enzimas clave fueron purificadas a partir de extractos de hígado. Según se ha visto, se puede considerar que el ciclo del ácido cítrico es la etapa final de la glucólisis ya que resulta en la oxidación del acetil-CoA, uno de los productos de la glucólisis. Sin embargo, hay muchos organismos que no encuentran en la glucosa una fuente principal de carbono, y puede ser que la producción de equivalentes de ATP por vía de la glucólisis y del ciclo del ácido cítrico no sea una gran fuente de energía metabólica en esas especies.

Se necesita examinar la función de las enzimas del ácido cítrico en las bacterias para comprender su papel en organismos unicelulares simples. Esas funciones permitirían deducir las rutas que pudieron haber existido en las células primitivas que al final originaron a los complejos eucariotas. Por fortuna, ya se dispone de las secuencias de más de cien genomas procarióticos como resultado de los gigantescos progresos en la tecnología del ADN recombinante, y en los métodos de secuenciación del ADN. Ahora se puede examinar todo el complemento de las enzimas metabólicas en muchas y diversas especies de bacterias, para así preguntarse si ellas poseen las rutas descritas en este capítulo. Estos análisis son de gran ayuda para el desarrollo de los campos de la genómica comparativa, la evolución molecular y la bioinformática.

La mayor parte de las especies de bacterias no tiene un ciclo del ácido cítrico completo. Las versiones más comunes de un ciclo incompleto incluyen parte del lado izquierdo. Esta corta ruta lineal lleva a la producción de succinato, succinil-CoA o α-cetoglutarato por un proceso reductor que usa oxaloacetato como punto de partida. Esta ruta reductora es la inversa del ciclo tradicional que funciona en las mitocondrias de los eucariotas. Además, muchas especies de bacterias también tienen enzimas procedentes de parte del lado derecho del ciclo del ácido cítrico, en especial la citrato sintasa y la aconitasa. Eso les permite sintetizar citrato e isocitrato a partir de oxaloacetato y acetil-CoA. La presencia de una ruta bifurcada (figura 13.17) da como resultado la síntesis de todos los precursores de aminoácidos, porfirinas y ácidos grasos.

Hay cientos de especies diversas de bacterias que pueden sobrevivir y crecer en ausencia completa de oxígeno. Algunas son anaeróbicas obligadas; para ellas ¡el oxígeno es un veneno letal! Otras son anaeróbicas facultativas, pueden sobrevivir en ambientes sin oxígeno, y también en ambientes ricos en oxígeno. Un ejemplo es *E. coli*, especie que puede sobrevivir en ambos tipos de ambiente. Cuando crece en forma anaerobia, *E. coli* usa una versión de la bifurcación de la ruta, para producir los precursores metabólicos necesarios y evitar la acumulación de equivalentes reductores que no pueden volverse a oxidar mediante el sistema de transporte de electrones, que requiere oxígeno. Las bacterias como *E. coli* pueden crecer en ambientes donde el acetato es la única fuente de carbono orgánico. En este caso, emplean la ruta del glioxilato para convertir acetato en malato y oxaloacetato, para la síntesis de la glucosa.

Las primeras células vivas surgieron en un ambiente sin oxígeno hace más de tres mil millones de años. Sin duda, estas células primitivas poseían la mayor parte de las enzimas que interconvertían acetato, piruvato, citrato y oxaloacetato, porque esas enzimas



◀Figura 13.17
Ruta bifurcada para muchas especies de bacterias. El lado izquierdo de la bifurcación es una ruta reductora que lleva a la síntesis de succinato o de a-cetoglutarato en reacciones que se efectúan en dirección contraria a las del ciclo clásico del ácido cítrico. La rama de la derecha es una ruta oxidativa parecida a las primeras reacciones del ciclo clásico del ácido cítrico.

existen en la mayor parte de las bacterias modernas. El desarrollo de las ramas principales de la ruta bifurcada comenzó posiblemente con la evolución de la malato deshidrogenasa, a partir de una duplicación del gen de lactato deshidrogenasa. La aconitasa y la isocitrato deshidrogenasa evolucionaron a partir de enzimas que se usan en la síntesis de la leucina (isopropilmalato deshidratasa e isopropilmalato deshidrogenasa, respectivamente). (La ruta de biosíntesis de la leucina es más ubicua y más primitiva que el ciclo del ácido cítrico).

La extensión de la rama reductora continuó con la evolución de la fumarasa a partir de aspartasa. La aspartasa es una enzima bacteriana común que sintetiza fumarato a partir de L-aspartato. A su vez, el L-aspartato se sintetiza por aminación de oxaloacetato en una reacción catalizada por la aspartato transaminasa (sección 17.3). Es probable que al principio, las células primitivas usaran la ruta oxaloacetato → aspartato → fumarato para producir fumarato, antes de la evolución de la malato deshidrogenasa y la fumarasa. En muchas bacterias, la reducción de fumarato a succinato es catalizada por fumarato reductasa. El origen evolutivo de esta enzima compleja es muy especulativo, pero al menos una de las subunidades se relaciona con otra enzima del metabolismo de aminoácidos. La succinato deshidrogenasa, enzima que cataliza en forma preferente la reacción inversa en el ciclo del ácido cítrico, probablemente haya evolucionado después a partir de la fumarato reductasa mediante un evento de duplicación del gen.

La síntesis de α-cetoglutarato puede hacerse en ambas ramas de la ruta bifurcada. La rama reductora usa α-cetoglutarato:ferredoxina oxidorreductasa, enzima que se encuentra en muchas especies de bacterias que no tienen ciclo completo del ácido cítrico. La reacción que cataliza esta enzima no es reversible con facilidad. Con la evolución de α-cetoglutarato deshidrogenasa se pueden unir las dos ramas y formar una ruta cíclica. Es claro que la α-cetoglutarato deshidrogenasa y la piruvato deshidrogenasa comparten un ancestro común, y es probable que esa fuera la última enzima en evolucionar.

Algunas bacterias tienen un ciclo completo de ácido cítrico, pero se usa en dirección reductora para fijar CO_2 y formar moléculas orgánicas más complejas. Esta podría haber sido una de las presiones de selección que condujeron a una ruta completa. En el ciclo se requiere un aceptor terminal de electrones para oxidar NADH y QH_2 cuando funciona en la dirección oxidativa, más normal, que se ve en los eucariotas. Al principio, este aceptor terminal de electrones era azufre, o diversos sulfatos, y esas reacciones se siguen efectuando en muchas especies bacterianas anaeróbicas. niveles de oxígeno comenzaron a aumentar hace unos 2 500 millones de años, con la evolución de reacciones

fotosintéticas en las cianobacterias. Algunas bacterias, en particular las protobacterias, aprovecharon la disponibilidad de oxígeno cuando evolucionaron las reacciones de transporte de electrones asociadas a membrana. Una especie de protobacteria entró en una relación simbiótica con una célula eucariótica primitiva hace unos dos mil millones de años. Eso condujo a la evolución de las mitocondrias y a las versiones modernas del ciclo del ácido cítrico y del transporte de electrones en los eucariotas.

En la evolución de la ruta del ácido cítrico intervinieron varios de los mecanismos evolutivos que se describieron en el capítulo 10. Hay pruebas de duplicación de genes, extensión de rutas, retroevolución, inversión de rutas y robo de enzimas.

Resumen

1. El complejo de piruvato deshidrogenasa cataliza la oxidación de piruvato para formar acetil-CoA y CO_2. La reacción se acopla a la reducción de $NAD^{\oplus}$ a NADH. Estas reacciones acopladas de óxido-reducción se efectúan dentro de un complejo multienzimático grande, que contiene cofactores de pirofosfato de tiamina, lipoamida y FAD.

2. Por cada molécula de acetil-CoA que se oxida por el ciclo del ácido cítrico, se producen dos moléculas de CO_2, tres moléculas de $NAD^{\oplus}$ se reducen a NADH, una molécula de Q se reduce a QH_2 y se genera una molécula de GTP a partir de GDP + P_i (o de ATP a partir de ADP + P_i, dependiendo de la especie).

3. Las ocho reacciones del ciclo del ácido cítrico, catalizadas por enzimas, pueden funcionar como catalizador de varios pasos.

4. La oxidación de las coenzimas reducidas generadas por el ciclo del ácido cítrico causa la formación de aproximadamente 10 moléculas de ATP por molécula de acetil-CoA que entra a la ruta, para dar un total de 32 moléculas de ATP por oxidación completa de una molécula de glucosa. En los eucariotas, el rendimiento general se reduce a 30 moléculas de ATP, porque se requiere ATP para transportar al NADH e introducirlo a las mitocondrias.

5. La oxidación del piruvato se regula en los pasos catalizados por el complejo de piruvato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa y el complejo de α-cetoglutarato deshidrogenasa.

6. Además de su papel en el catabolismo oxidativo, el ciclo del ácido cítrico proporciona precursores para rutas de biosíntesis. Las reacciones anapleróticas reabastecen los compuestos intermedios del ciclo.

7. La ruta del glioxilato, modificación del ciclo del ácido cítrico, permite a muchos organismos usar acetil-CoA para generar compuestos intermedios de cuatro carbonos, para la gluconeogénesis.

8. Es probable que el ciclo del ácido cítrico evolucionara a partir de la ruta bifurcada, más primitiva, que se encuentra en muchas especies modernas de bacterias.

Problemas

1. *a*) El ciclo del ácido cítrico convierte una molécula de citrato en una molécula de oxaloacetato, que se requiere para que continúe el ciclo. Si se agotan otros compuestos intermedios del ciclo, al ser usados como precursores para biosíntesis de aminoácidos, ¿puede efectuarse una síntesis neta de oxaloacetato a partir de acetil-CoA por vía de las enzimas del ciclo del ácido cítrico?

b) ¿Cómo puede continuar funcionando el ciclo, si hay insuficiente oxaloacetato?

2. El fluoroacetato, molécula muy tóxica que bloquea al ciclo del ácido cítrico, se ha usado como veneno de roedores. En forma enzimática se convierte, *in vivo*, en fluoroacetil-CoA, que a continuación se convierte en 2R,3S-fluorocitrato por acción de la citrato sintasa; este es un potente inhibidor competitivo de la siguiente enzima en la ruta. Anticipe cuál será el efecto del fluoroacetato sobre las concentraciones de los productos intermedios en el ciclo del ácido cítrico. ¿Cómo se puede superar el bloqueo del ciclo?

3. Calcule la cantidad de moléculas de ATP generado por las siguientes reacciones netas del ciclo del ácido cítrico. Suponga que se oxidan todo el NADH y la QH_2 para formar ATP, y que el piruvato se convierte en acetil-CoA, y que la lanzadera de malato-aspartato está funcionando.

a) 1 Piruvato $\longrightarrow$ 3 CO_2

b) Citrato $\longrightarrow$ Oxaloacetato + 2 CO_2

4. Cuando se oxida por completo una molécula de glucosa para producir seis moléculas de CO_2 bajo las condiciones del problema 3, ¿qué porcentaje de ATP se produce por fosforilación oxidativa, y qué porcentaje se produce por fosforilación a nivel de sustrato?

5. El beriberi es una enfermedad causada por deficiencia dietética de la vitamina B_1 (tiamina), y se caracteriza por síntomas neurológicos y cardiacos así como por mayores concentraciones de piruvato y α-cetoglutarato en la sangre. ¿Cómo es que la deficiencia de tiamina causa las mayores concentraciones de piruvato y α-cetoglutarato?

6. En tres experimentos por separado, se metaboliza piruvato marcado con ^{14}C en el C-1, en el C-2 o en el C-3 mediante el complejo de piruvato deshidrogenasa y el ciclo del ácido cítrico. ¿Cuál molécula de piruvato marcada es la primera en formar $^{14}CO_2$? ¿Cuál es la última en formar $^{14}CO_2$?

7. Los pacientes en choque tienen menor conducción de O_2 a los tejidos, menor actividad del complejo de piruvato deshidrogenasa y mayor metabolismo anaeróbico. El exceso de piruvato se convierte en lactato, que se acumula en los tejidos y en la sangre, causando acidosis láctica.
   a) Ya que el O_2 no es reactivo ni producto del ciclo del ácido cítrico, ¿por qué las bajas concentraciones de O_2 disminuyen la actividad del complejo de piruvato deshidrogenasa?
   b) Para aliviar la acidosis láctica, a los pacientes en choque a veces se les administra dicloroacetato, el cual inhibe la piruvato deshidrogenasa cinasa. ¿En qué forma este tratamiento afecta la actividad del complejo de piruvato deshidrogenasa?

8. Una deficiencia de una enzima del ciclo del ácido cítrico, tanto en las mitocondrias como en el citosol de algunos tejidos (por ejemplo, los linfocitos en la sangre) causa graves anormalidades neurológicas en los recién nacidos. La enfermedad se caracteriza por excreción de cantidades anormalmente grandes de α-cetoglutarato, succinato y fumarato en la orina. ¿Qué deficiencia enzimática produciría esos síntomas?

9. La acetil-CoA inhibe la dihidrolipoamida acetiltransferasa (E_2 del complejo de piruvato deshidrogenasa), pero activa el componente de piruvato deshidrogenasa cinasa en el complejo de la piruvato deshidrogenasa. ¿Cómo es que estas dos acciones distintas de la acetil-CoA son consistentes con la regulación general del complejo?

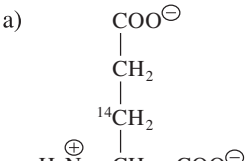
10. La deficiencia del complejo piruvato deshidrogenasa es una enfermedad que causa diversos efectos metabólicos y neurológicos. Esta deficiencia puede ocasionar acidosis láctica en los niños afectados. Otros síntomas clínicos consisten en mayores concentraciones de piruvato y alanina en la sangre. Explique por qué aumentan las concentraciones de piruvato, lactato y alanina en individuos con deficiencia del complejo de piruvato deshidrogenasa.

11. Como respuesta a una señal de contracción, y la mayor necesidad resultante de ATP en los músculos de los vertebrados, se libera Ca^{2+} al citosol desde sitios de almacenamiento en el retículo endoplásmico. ¿Cómo responde el ciclo del ácido cítrico a la entrada de Ca^{2+} para satisfacer la mayor necesidad de ATP celular?

12. *a*) La degradación de la alanina forma piruvato, y la degradación de la leucina forma acetil-CoA. ¿Puede la degradación de esos aminoácidos reabastecer la reserva de compuestos intermedios en el ciclo del ácido cítrico?
   b) Las grasas (triacilgliceroles) almacenadas en el tejido adiposo son una fuente importante de energía en los animales. Los ácidos grasos se degradan a acetil-CoA, que activa la piruvato carboxilasa. ¿Cómo ayuda la activación de esta enzima a recuperar energía a partir de los ácidos grasos?

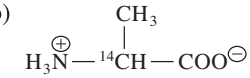
13. Los aminoácidos que resultan de la degradación de proteínas se pueden seguir metabolizando por conversión a productos intermedios del ciclo del ácido cítrico. Si la degradación de una proteína marcada produce los siguientes aminoácidos marcados, escriba la estructura del primer compuesto intermedio en el ciclo del ácido cítrico al cual se convertirían esos aminoácidos, y en cada caso identifique al carbono marcado.

a)



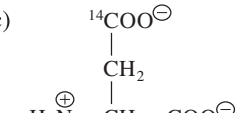
Glutamato

b)



Alanina

c)



Aspartato

14. *a*) ¿Cuántas moléculas de ATP se generan cuando se convierten dos moléculas de acetil-CoA en cuatro moléculas de CO_2 por vía del ciclo del ácido cítrico? ¿Cuántas moléculas de ATP se generan cuando se convierten dos moléculas de acetil-CoA en oxaloacetato, en el ciclo del glioxilato?
   b) ¿Cómo se relacionan las producciones de ATP con las funciones primarias de las dos rutas?

15. Las actividades de la PFK-2 y la fructosa 2,6-*bi*fosfatasa están contenidas en una proteína bifuncional que ejerce un control estricto sobre la glucólisis y la gluconeogénesis por la acción de fructosa 2,6-*bi*fosfato. Describa otra proteína que contenga actividades de cinasa y fosfatasa en una sola molécula. ¿Qué rutas controla?

Lecturas seleccionadas

Complejo de piruvato deshidrogenasa

Harris, R. A., Bowker-Kinley, M. M., Huang, B. y Wu, P. (2002). Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex. *Advances in Enzyme Regulation* 42:249-259.

Maeng, C.-Y., Yazdi, M. A., Niu, X.-D., Lee, H. Y. y Reed, L. J. (1994). Expression, purification and characterization of the dihydrolipoamide dehydrogenase-binding protein of the pyruvate dehydrogenase complex from *Saccharomyces cerevisiae. Biochemistry* 33:13801-13807.

Mattevi, A., Obmolova, G., Schulze, E., Kalk, K. H., Westphal, A. H. de Kok, A. y Hol. W. G. J. (1992). Atomic structure of the cubic core of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Science* 255:1544-1550.

Reed, L. J. y Hackert, M. L. (1990). Structure—function relationships in dihydrolipoamide acyltransferases. *J. Biol. Chem.* 265:8971-8974.

Ciclo del ácido cítrico

Beinert, H. y Kennedy, M. C. (1989). Engineering of protein bound iron-sulfur clusters. *Eur. J. Biochem.* 186:5-15. Explica el mecanismo del enlazamiento de citrato a aconitasa.

Gruer, M. J., Artymiuk, P. J. y Guest, J. R. (1997). The aconitase family: three structural variations on a common theme. *Trends Biochem. Sci.* 22:3-6.

Hurley, J. H., Dean, A. M., Sohl, J. L., Koshland, D. E. Jr. y Stroud, R. M. (1990). Regulation of an enzyme by phosphorylation at the active site. *Science* 249:1012-1016. Describe la regulación de isocitrato deshidrogenasa en *E. coli.*

Kay, J. y Weitzmann, P. D. J., eds. (1987). *Krebs' Citric Acid Cycle—Half a Century and Still Turning* (London: The Biochemical Society). Trabajos que describen una variedad de consideraciones de la ruta. Publicados para celebrar el 50o. aniversario del descubrimiento de Krebs.

McCormack, J. G. y Denton, R, M. (1988). The regulation of mitochondrial function in mammalian cells by Ca^{2+} ions. *Biochem. Soc. Trans.* 109:523-527.

Remington, S. J. (1992). Mechanisms of citrate synthase and related enzymes (triose phosphate isomerase and mandelate racemase). *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2:730-735. Describe la importancia y los mecanismos de desprotonación de enlaces C—H.

Williamson, J. R. y Cooper, R. H. (1980). Regulation of the citric acid cycle in mammalian systems. *FEBS Lett.* 117 (Suppl.):K73-K85.

Wolodko, W. T., Fraser, M. E., James, M. N. G. y Bridger, W. A. (1994). The crystal structure of succinyl-CoA synthetase from *Escherichia coli* at 2.5-Å resolution. *J. Biol. Chem.* 269:10883-10890.

Yankovskaya, V., Horsefield, R., Törnroth, S., Luna-Chavez, C., Miyoshi, H., Léger, C. Byrne, B., Cecchini, G. e Iwata, S. (2003). Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science* 299:700-704.

Ciclo del glioxilato

Beevers, H. (1980). The role of the glyoxylate cycle. En *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise*, Vol. 4, P. K. Stumpf y E. E. Conn, eds. (New York: Academic Press), pp. 117-130.

14

capítulo
catorce

Transporte de electrones y síntesis de ATP

Se ha llegado ahora a una de las rutas metabólicas más complicadas que tiene la bioquímica: el sistema de transporte de electrones asociado a membrana y acoplado a la síntesis de ATP. El papel de esta ruta es convertir equivalentes reductores en ATP. Suele imaginarse que los equivalentes reductores son productos de la glucólisis y del ciclo del ácido cítrico, ya que la oxidación de glucosa y acetil-CoA se acopla a la reducción de $NAD^{\oplus}$ y Q. En este capítulo se aprenderá que la reoxidación siguiente de NADH y QH_2 da como resultado el paso de electrones mediante un sistema de transporte asociado a membrana, donde la energía liberada se puede guardar con la fosforilación de ADP a ATP. Al final, los electrones pasan a un aceptor o receptor terminal de electrones. En la mayoría de las especies este receptor terminal de electrones es el oxígeno molecular (O_2), y es por eso que el proceso general tiene el nombre de fosforilación oxidativa.

La ruta combinada de transporte de electrones y síntesis de ATP implica numerosas enzimas y coenzimas. También dependen por completo de la presencia de un compartimiento de membrana, ya que uno de los pasos clave en el acoplamiento del transporte de electrones y la síntesis de ATP consiste en la creación de un gradiente de pH a través de una membrana. En los eucariotas, es la membrana mitocondrial interna, y en los procariotas es la membrana plasmática.

Este capítulo comienza con un repaso de la termodinámica de un gradiente de protones, y la forma en que puede impulsar la síntesis de ATP. A continuación se describirá la estructura y funciones de los complejos de transporte de electrones asociados a membrana, y del complejo de ATP sintasa. Se terminará con una descripción de otros aceptores de electrones y con una explicación breve de algunas enzimas que participan en el metabolismo del oxígeno. En el capítulo 15 se describirá la ruta parecida de transporte de electrones asociada a membrana, y de síntesis de ATP que funciona durante la fotosíntesis.

Arriba: El guepardo, cuya capacidad de metabolismo aeróbico lo hace uno de los animales más rápidos en la Tierra.

Las coenzimas que se mencionan en este capítulo se describieron con detalle en el capítulo 7: $NAD^{\oplus}$, sección 7.4; ubiquinona, sección 7.14; FMN y FAD, sección 7.5; grupos de hierro-azufre, sección 7.1, y citocromos, sección 7.16

14.1 Descripción general del transporte de electrones asociado a membrana y la síntesis de ATP

El transporte de electrones asociado a membrana requiere que haya varios complejos enzimáticos embebidos en una membrana. Comenzaremos examinando la ruta que existe en las mitocondrias. Después veremos las propiedades comunes de los sistemas procarióticos y eucarióticos. Los dos procesos de transporte de electrones asociado a membrana y de síntesis de ATP, se acoplan en forma estrecha. En general, ninguno de ellos puede efectuarse sin el otro.

En la ruta completa, los electrones pasan del NADH al receptor terminal de electrones. Hay muchos y diferentes receptores terminales de electrones, pero nos interesa más la ruta que se encuentra en las mitocondrias eucarióticas, donde el oxígeno molecular (O_2) se reduce para formar agua. A medida que los electrones siguen la cadena de transporte de electrones, desde NADH a O_2, la energía que liberan se usa para transferir protones desde el interior de la mitocondria al espacio entre la membrana doble. Este gradiente de protones se usa para impulsar la síntesis de ATP, en una reacción catalizada por ATP sintasa (figura 14.1). Un sistema muy parecido funciona en las bacterias.

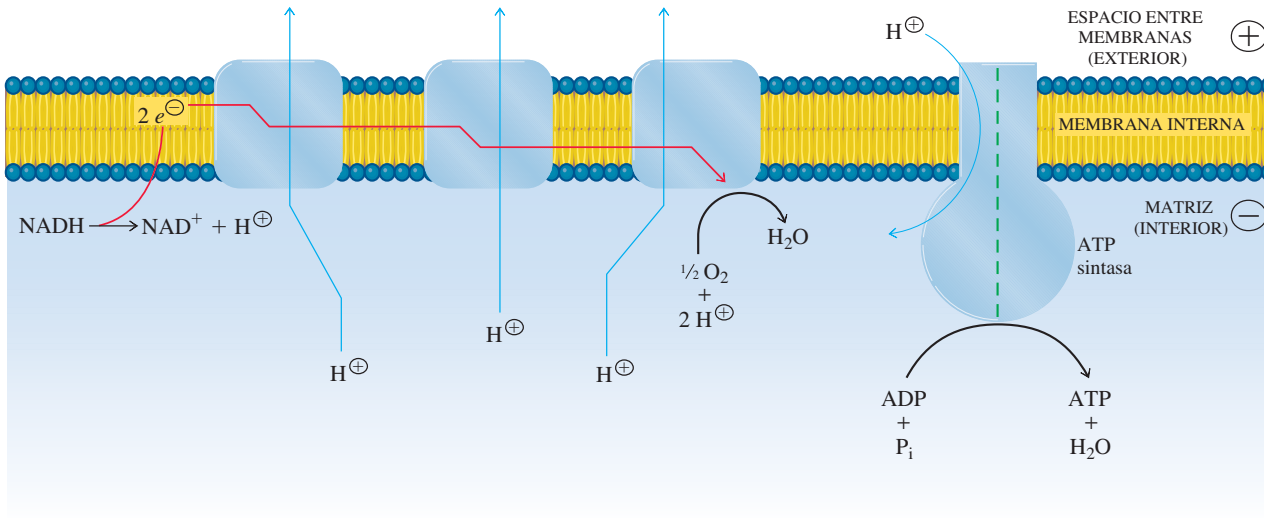
Toda la ruta mitocondrial se conoce con frecuencia como fosforilación oxidativa porque, históricamente, el problema bioquímico era explicar la vinculación entre la utilización del oxígeno y la síntesis de ATP. También verá el lector referencias frecuentes a la "respiración" y al "transporte de electrones respiratorio" . Estos términos también se refieren a la ruta que aprovecha al oxígeno como receptor terminal de electrones.

Figura 14.1 ▼
Panorama del transporte de electrones asociado a membrana y síntesis de ATP en mitocondrias. Se produce un gradiente de concentración de protones en reacciones catalizadas por la cadena de transporte de electrones. Como los electrones procedentes de sustratos reducidos pasan por los complejos, los protones son traslocados a través de la membrana mitocondrial interna, de la matriz al espacio entre membranas. La energía libre almacenada en el gradiente de concentración de protones se usa cuando los protones atraviesan de regreso la membrana por la vía de la ATP sintasa; su entrada de regreso se acopla a la conversión de ADP y P_i en ATP.

14.2 La mitocondria

Mucha de la oxidación aeróbica de las biomoléculas en los eucariotas se efectúa en la mitocondria. Este organelo es el sitio del ciclo del ácido cítrico, y de la oxidación de ácidos grasos; ambos procesos generan coenzimas reducidas. Las coenzimas reducidas son oxidadas por los complejos de transporte de electrones. La estructura de una mitocondria típica se muestra en la figura 14.2.

La cantidad de mitocondrias en las células varía en forma radical. Algunas algas unicelulares sólo contienen una mitocondria, mientras que la célula del protozoario *Chaos chaos* contiene medio millón de mitocondrias. Una célula hepática de mamífero contiene hasta 5000 mitocondrias. La cantidad de mitocondrias se relaciona con las



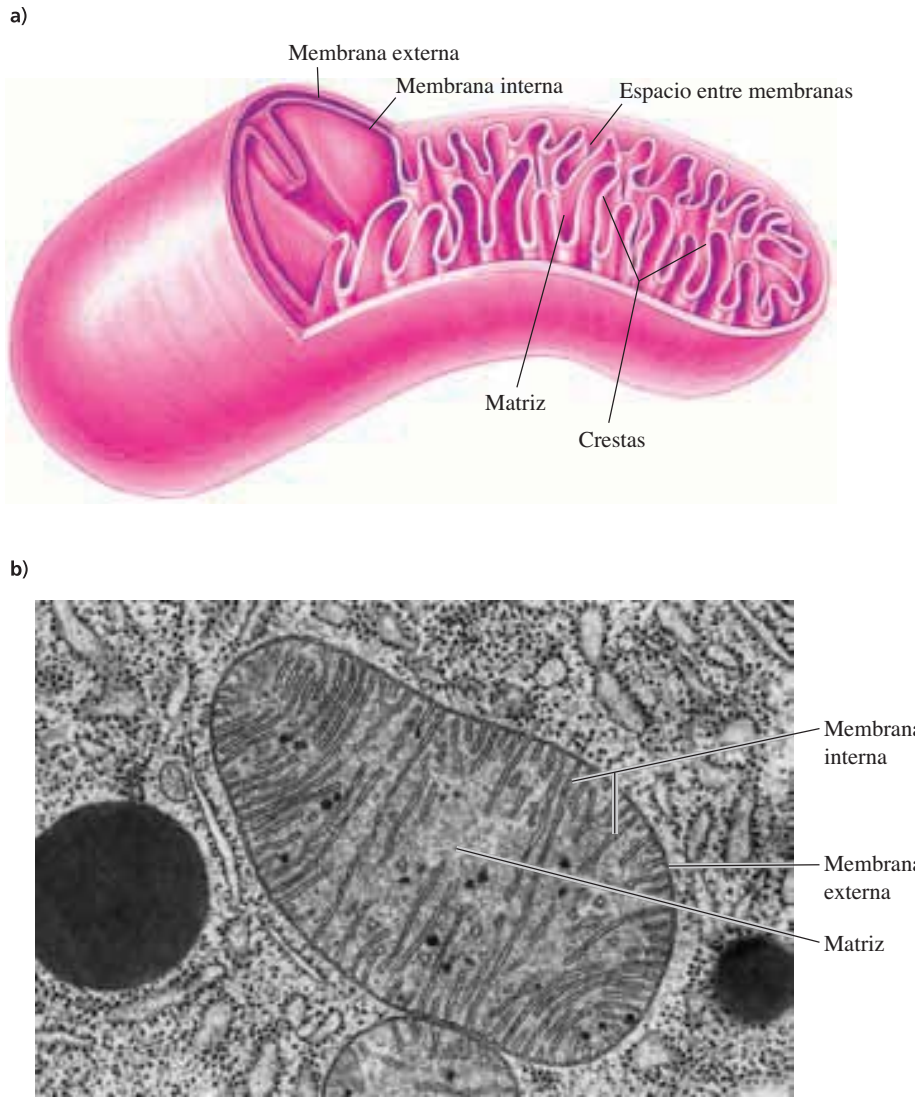


Figura 14.2 ▲
Estructura de la mitocondria. La membrana mitocondrial externa es totalmente permeable frente a moléculas pequeñas, pero la membrana interna es impermeable a sustancias polares e iónicas. La membrana interna está muy plegada y con convoluciones que forman las estructuras llamadas crestas. Los complejos de proteína que catalizan las reacciones del transporte de electrones y de la síntesis de ATP están en la membrana interna. **a)** Ilustración. **b)** Micrografía electrónica: corte longitudinal de una célula pancreática de murciélago.

necesidades generales de energía de la célula. El tejido muscular blanco, que depende de la glucólisis anaeróbica para satisfacer sus necesidades de energía, contiene relativamente pocas mitocondrias. Los músculos de la quijada del caimán, de contracción rápida pero que se agotan de inmediato, son un ejemplo extremo de músculo blanco. Los caimanes pueden cerrar bruscamente sus quijadas, con velocidad y fuerza asombrosa, pero no pueden continuar este movimiento más allá de muy pocas repeticiones. En contraste, el tejido muscular rojo tiene muchas mitocondrias. Las células de los músculos para volar, de las aves migratorias, son ejemplos de células musculares rojas. Esos músculos deben sostener producciones apreciables y continuas de potencia. Esta potencia requiere cantidades prodigiosas de ATP.

Las mitocondrias varían mucho de tamaño y forma entre las distintas especies, en diversos tejidos y hasta en una misma célula. Una mitocondria típica de mamífero tiene 0.2 a 0.8 μm de diámetro, y de 0.5 a 1.5 μm de longitud, más o menos el tamaño y forma

de una célula de *E. coli*. (Recuérdese, del capítulo 1, que las mitocondrias son descendientes de células bacterianas que entraron en una relación de simbiosis con una célula eucariótica primitiva).

Las mitocondrias están separadas del citoplasma por una membrana doble. Las dos membranas tienen propiedades muy diferentes. La membrana mitocondrial externa tiene pocas proteínas. Una de estas proteínas es la porina de transmembrana (sección 9.11A), que forma canales que permiten la difusión libre de iones y metabolitos solubles en agua, con pesos moleculares menores de 10 000. En contraste, la membrana mitocondrial interna es muy rica en proteínas, con una relación de proteína a lípido aproximadamente de 4:1 en masa. Esta membrana es permeable a moléculas sin carga, como agua, O_2 y CO_2, pero es una barrera para los protones y las sustancias polares mayores y sustancias iónicas. Estas sustancias polares deben ser transportadas en forma activa a través de la membrana interna, usando proteínas específicas de transporte, como piruvato translocasa (sección 13.1). La entrada de metabolitos aniónicos al interior de una mitocondria, que tienen carga negativa, es desfavorable desde el punto de vista energético. Esos metabolitos se suelen intercambiar por otros aniones desde el interior, o son acompañados por protones que siguen al gradiente de concentración que se genera por la cadena de transporte de electrones.

Con frecuencia, la membrana interna está muy plegada y el resultado es una superficie muy grande. A los pliegues se les llama crestas. La expansión y plegado de la membrana interna forma también un espacio entre membranas muy expandido (figura 14.2a). Como la membrana externa es totalmente permeable frente a moléculas pequeñas, el espacio entre membranas tiene más o menos la misma composición de iones y metabolitos que el citosol que rodea a la mitocondria.

El contenido de la matriz incluye al complejo de piruvato deshidrogenasa, las enzimas del ciclo del ácido cítrico (exceptuando el complejo de succinato deshidrogenasa, que está incrustado en la membrana interna), y la mayor parte de las enzimas que catalizan la oxidación de los ácidos grasos. La concentración de proteínas en la matriz es muy alta (se aproxima a 500 mg mL^{-1}). Sin embargo, la difusión sólo es un poco menos rápida que en el citosol. La matriz contiene también metabolitos así como iones inorgánicos, y una reserva de $NAD^{\oplus}$ y $NADP^{\oplus}$ que queda separada de las coenzimas nucleótido piridinas del citosol. El ADN mitocondrial, y todas las enzimas que se requieren para replicar, transcribir y traducir ADN, están en la matriz. El ADN mitocondrial contiene muchos de los genes que codifican las proteínas del transporte de electrones.

14.3 Teoría quimiosmótica y la fuerza protonmotriz

Antes de describir las reacciones individuales de la fosforilación oxidativa se examinará la naturaleza de la energía almacenada en un gradiente de concentración de protones. La **teoría quimiosmótica** es el concepto de que un gradiente de concentración de protones sirve como depósito de energía que impulsa la formación de ATP. Los elementos esenciales de esta teoría fueron formulados originalmente por Peter Mitchel, a principios de la década de 1960. En ese momento, el mecanismo por el cual las células efectúan la fosforilación oxidativa era tema de investigaciones intensas y de mucha controversia. La ruta que une a las reacciones de oxidación con la fosforilación de ADP no se conocía. Habían fracasado muchas tentativas para identificar un metabolito fosforilado rico en energía que pudiera transferir un grupo fosforilo. Hoy, gracias a décadas de trabajos de muchos investigadores, la formación y la disipación de gradientes iónicos son tema central de la bioenergética. A Mitchell se le otorgó el Premio Nobel de Química en 1978 por su aportación al conocimiento de la bioenergética.

▲Peter Mitchell (1920-1992) recibió el Premio Nobel de Química en 1978 "por su contribución a la comprensión de la transferencia de energía biológica mediante la formulación de la teoría quimiosmótica."

A. Antecedentes históricos: la teoría quimiosmótica

Cuando Mitchell propuso la teoría quimiosmótica se había acumulado mucha información sobre la oxidación de sustratos y la oxidación y reducción cíclica de portadores mitocondriales de electrones. En 1956, Britton Chance y Ronald Williams habían demostrado

que cuando las mitocondrias aisladas intactas se suspenden en una solución reguladora de fosfato, oxidan a los sustratos y consumen oxígeno sólo cuando se adiciona ADP a la suspensión. En otras palabras, la oxidación de un sustrato se debe *acoplar* a la fosforilación de ADP. Experimentos posteriores demostraron que la respiración se efectúa con rapidez hasta que se fosforila todo el ADP (figura 14.3a), y que la cantidad de O_2 consumido depende de la cantidad de ADP agregado.

Unos compuestos sintéticos, llamados **desacopladores**, estimulan la oxidación de los sustratos en ausencia de ADP (figura 14.3b). El fenómeno de desacoplamiento ayudó a demostrar cómo se vinculan las reacciones de oxidación con la formación de ATP. En presencia de un desacoplador, la utilización del oxígeno (respiración) prosigue hasta que se consume todo el oxígeno disponible. Esta oxidación rápida de los sustratos se lleva a cabo con poca o ninguna fosforilación de ADP. En otras palabras, estos compuestos sintéticos desacoplan la oxidación de la fosforilación. Hay muchas clases distintas de desacopladores, y tienen poca similitud química, excepto que todos ellos son ácidos débiles solubles en lípidos. Tanto sus formas protonada como de base conjugada pueden cruzar la membrana mitocondrial interna; la base conjugada aniónica conserva la solubilidad en lípidos, porque la carga negativa está deslocalizada. En la figura 14.4 se muestran las estructuras de resonancia de un desacoplador típico, el 2,4-dinitrofenol.

El efecto de los desacopladores, y muchos otros experimentos, indicaron que el transporte de electrones (utilización de oxígeno) y la síntesis de ATP estaban acoplados, en el caso normal, pero se desconocía el mecanismo básico. Durante la década de 1960 se creía que debía haber varios pasos en el proceso de transporte de electrones, donde el cambio de energía libre de Gibbs fuera suficiente para impulsar la síntesis de ATP. Se creía que esta forma de acoplamiento era análoga a la fosforilación a nivel sustrato.

Mitchell propuso la idea radical de que la acción de los complejos enzimáticos mitocondriales genera un gradiente de concentración de protones a través de la membrana mitocondrial interna. Sugirió que ese gradiente suministra la energía para la fosforilación de ADP por acoplamiento *indirecto* con el transporte de electrones. Las ideas de Mitchell explicaban el efecto de los agentes desacopladores liposolubles: se unen a protones en el citosol, los llevan atravesando la membrana interna y los sueltan en la matriz, y con ello disipan el gradiente de concentración de protones. Los portadores de protones desacoplan el transporte de electrones (oxidación) de la síntesis de ATP, porque los protones entran a la matriz sin pasar por la ATP sintasa.

La actividad de la ATP sintasa fue reconocida por primera vez en 1948 como actividad de ATPasa en mitocondrias dañadas (es decir, que las mitocondrias dañadas catalizan la hidrólisis de ATP a ADP y P_i). La mayoría de los investigadores supusieron que la ATPasa mitocondrial cataliza la reacción contraria en las mitocondrias no dañadas. Sucede que esa hipótesis es correcta. En la década de 1960, Efraim Racker y sus colaboradores aislaron y caracterizaron a esta ATPasa oligomérica. Al observar la expulsión de protones en la hidrólisis de ATP en las mitocondrias se demostró la reversibilidad de la reacción de la ATPasa impulsada por protones. Esto fue respaldado por experimentos con pequeñas vesículas en la membrana, donde se incorporó la enzima a la membrana.

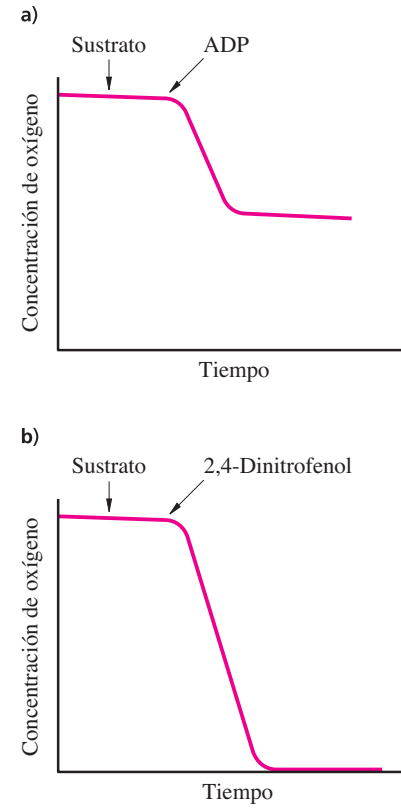


Figura 14.3 ▲
Utilización de oxígeno y síntesis de ATP en mitocondrias. **a)** En presencia de exceso de P_i y de sustrato, las mitocondrias intactas consumen oxígeno rápidamente sólo cuando se agrega ADP. Cuando se ha fosforilado todo el ADP, cesa la utilización de oxígeno. **b)** Si se agrega el desacoplador 2,4-dinitrofenol, puede seguir la oxidación del sustrato en ausencia de fosforilación de ADP. Las flechas indican los momentos en los que se hicieron las adiciones a la solución de mitocondrias suspendidas.

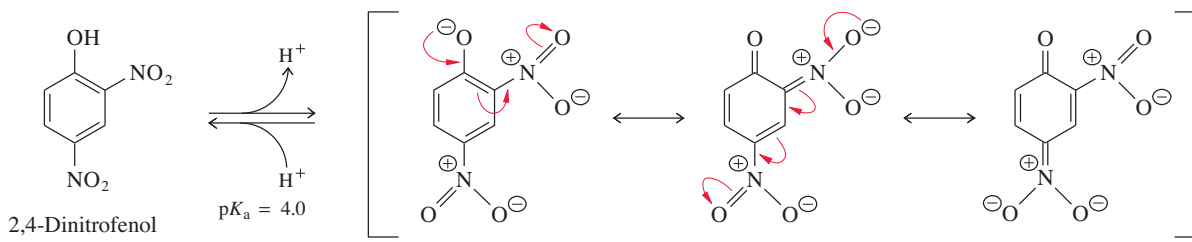


Figura 14.4 ▲
Formas protonada y de base conjugada del 2,4-dinitrofenol. El anión dinitrofenolato está estabilizado por resonancia, y su carga iónica negativa se distribuye extensamente sobre la estructura anular de la molécula. Al estar deslocalizada la carga negativa, las formas de ácido y de base del dinitrofenol son lo bastante hidrofóbicas como para disolverse en la membrana.

Cuando se creó un gradiente de protones adecuado a través de la membrana de vesícula, se sintetizó ATP a partir de ADP y P_1.

B. La fuerza protonmotriz

Los protones se traslocan hacia el espacio entre las membranas, mediante complejos de transporte de electrones asociados a membrana, y regresan a la matriz por vía de la ATP sintasa. Este flujo circular forma un circuito que se parece al circuito eléctrico. La energía del gradiente de concentración de protones, llamada **fuerza protonmotriz**, es análoga a la fuerza electromotriz de la electroquímica (sección 10.9A). Esta analogía se ilustra en la figura 14.5.

Imaginemos una reacción como la reducción de oxígeno molecular debida al agente reductor XH_2 en una celda electroquímica.

$$XH_2 + {}^1\!/_2 O_2 \rightleftharpoons X + H_2O \qquad \textbf{(14.1)}$$

Los electrones del XH_2 pasan por un conductor que une a los dos electrodos, donde suceden las semirreacciones de oxidación y reducción. Los electrones fluyen desde el electrodo donde se oxida el XH_2.

$$XH_2 \rightleftharpoons X + 2\,H^{\oplus} + 2\,e^{\ominus} \qquad \textbf{(14.2)}$$

y van al electrodo donde se reduce el O_2.

$${}^1\!/_2 O_2 + 2\,H^{\oplus} + 2\,e^{\ominus} \rightleftharpoons H_2O \qquad \textbf{(14.3)}$$

En la celda electroquímica, los protones pasan libremente de una celda de reacción a la otra a través del solvente que hay en un puente salino. Los electrones se mueven a través de un alambre externo, debido a una diferencia de potencial entre las celdas. Este potencial se mide en volts y es la fuerza electromotriz. La dirección del flujo de electrones y el grado de reducción del agente oxidante dependen de la diferencia de energía libre entre XH_2 y O_2, que a su vez depende de sus potenciales de reducción respectivos.

En las mitocondrias, son los protones y no los electrones los que pasan por la conexión externa, un circuito acuoso que conecta a la cadena de transporte de electrones asociado a membrana y a la ATP sintasa. Esta conexión es análoga al alambre de la

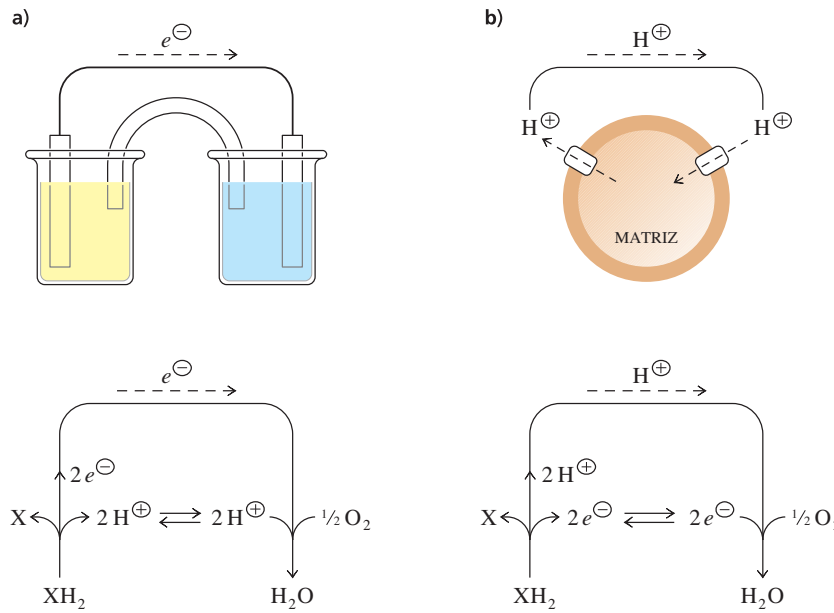


Figura 14.5 ▶
Analogía de la fuerza electromotriz y la fuerza protonmotriz. **a)** En una celda electroquímica, los electrones pasan del agente reductor XH_2 al agente oxidante O_2 a través de un alambre que conecta a los dos electrodos. El potencial eléctrico medido entre las celdas es la fuerza electromotriz. **b)** Cuando se invierte la configuración, es decir, la ruta externa de los electrones se reemplaza por una ruta acuosa para protones, el potencial es la fuerza protonmotriz. En las mitocondrias, los protones se traslocan a través de la membrana interna cuando los electrones se transportan dentro de la membrana por la cadena de transporte de electrones.

reacción electroquímica. Los electrones siguen pasando del agente reductor XH_2 al agente oxidante O_2, pero en este caso es a través de la cadena de transporte de electrones asociada a membrana. La energía libre de estas reacciones de oxidación-reducción se almacena como fuerza protonmotriz del gradiente de concentración de protones, y se recupera en la fosforilación de ADP.

Recuérdese, de la sección 9.11, que el cambio de energía libre de Gibbs para transportar una molécula polar es

$$\Delta G_{\text{transporte}} = 2.303\ RT \log \frac{[A_{\text{int}}]}{[A_{\text{ext}}]} + z\mathcal{F}\Delta\Psi \qquad \textbf{(14.4)}$$

donde el primer término es la energía libre de Gibbs debida al gradiente de concentración, y el segundo término $(z\mathcal{F}\Delta\Psi)$ se debe a la diferencia de carga a través de la membrana. Para los protones, la carga por molécula es 1 ($z = 1.0$), y el cambio total de energía libre de Gibbs para el gradiente de protones es

$$\Delta G = 2.303\ RT \log \frac{[H^{\oplus}_{\text{int}}]}{[H^{\oplus}_{\text{ext}}]} + \mathcal{F}\Delta\Psi = \mathcal{F}\Delta\Psi - 2.303\ RT\ \Delta\text{pH} \qquad \textbf{(14.5)}$$

Esta es una medida de la fuerza protonmotriz generada por el gradiente de protones. En las mitocondrias hepáticas, el potencial a través de la membrana ($\Delta\Psi$) es –0.17 V (el interior negativo) y la diferencia de pH es 0.5 ($\Delta\text{pH} = 0.5$). A 37 °C ($T = 310$ K), la energía libre de Gibbs disponible es

$$\Delta G = [96485 \times -0.17] - [2.303 \times 8.315 \times 310 \times 0.5] = -16402\ \text{J mol}^{-1} - 2968\ \text{J mol}^{-1} = -19.4\ \text{kJ mol}^{-1} \qquad \textbf{(14.6)}$$

Eso quiere decir que el transporte de regreso, de un solo protón, a través de la membrana se asocia a un cambio de energía libre de –19.4 kJ mol^{-1}. El cambio de energía libre de Gibbs estándar para la síntesis de ATP a partir de ADP es 32 kJ mol^{-1} ($\Delta G^{\circ\prime} = 32$ kJ mol^{-1}) (sección 10.6). Así, debe traslocarse más de un protón por cada molécula de ATP sintetizada.

Nótese que 85% ($-16.4/-19.4 = 85\%$) del cambio de energía libre de Gibbs se debe al gradiente de carga a través de la membrana, y sólo 15% ($-3.0/-19.4 = 15\%$) se debe al gradiente de concentración de protones.

14.4 Transporte de electrones

Ahora describiremos las reacciones de la cadena de transporte de electrones asociada a membrana. En la membrana interna de las mitocondrias, o en la membrana plasmática de las bacterias, se encuentran cuatro conjuntos oligoméricos de proteínas. Los complejos enzimáticos han sido aislados en sus formas activas, solubilizándolos con cuidado mediante detergentes. Cada complejo cataliza una parte separada del proceso de transducción de energía. A esos complejos se les asignan los números I al IV. El complejo V es la ATP sintasa.

A. Complejos I a IV

Los complejos de transporte de electrones se pueden difundir en forma independiente en la membrana, pero tienden a formar grandes estructuras a través de interacciones débiles mutuas. Los cuatro complejos enzimáticos contienen una gran variedad de centros de óxido-reducción. Pueden ser cofactores, como FAD, FMN o ubiquinona (Q). Otros centros tienen grupos de Fe-S, coenzimas de proteína como los citocromos, con contenido de hemo, y proteínas con cobre. El flujo de electrones se efectúa por reducción y oxidación

de esos centros redox, y el flujo va desde un agente reductor hacia un agente oxidante. Hay muchas reacciones que implican procesos de transporte de electrones en la bioquímica. Ya hemos visto varias de ellas en los capítulos anteriores. Un buen ejemplo es el del flujo de electrones en el complejo de piruvato deshidrogenasa (sección 13.1).

Los electrones pasan a través de los componentes de una cadena de transporte de electrones en dirección de mayor potencial de reducción. Los potenciales de reducción de cada centro redox están entre los del NADH, reductor enérgico fuerte, y los del oxidante terminal, O_2. Las coenzimas móviles, ubiquinona (Q) y citocromo *c*, sirven como eslabones entre distintos complejos de la cadena de transporte de electrones. Q transfiere electrones de los complejos I o II al complejo III. El citocromo *c* transfiere electrones del complejo III al complejo IV. El complejo IV usa los electrones para reducir O_2 a agua. El orden de las reacciones de transporte de electrones se muestra en la figura 14.6, en función de una escala de potencial estándar de reducción a la izquierda. La escala de la derecha muestra los cambios de energía libre en relación con los del receptor terminal de electrones (O_2).

Recuérdese, de la sección 10.9, que el potencial de reducción estándar (en volts) tiene una relación directa con el cambio de energía libre de Gibbs estándar (en kJ mol^{-1}) mediante la fórmula

$$\Delta G^{\circ\prime} = -n\mathcal{F}\Delta E^{\circ\prime} \qquad \textbf{(14.7)}$$

Como se puede ver en la figura 14.6, una cantidad apreciable de energía se desprende durante el proceso de transporte de electrones. Gran parte de esta energía se almacena en la fuerza protonmotriz que impulsa a la síntesis de ATP. Este acoplamiento del

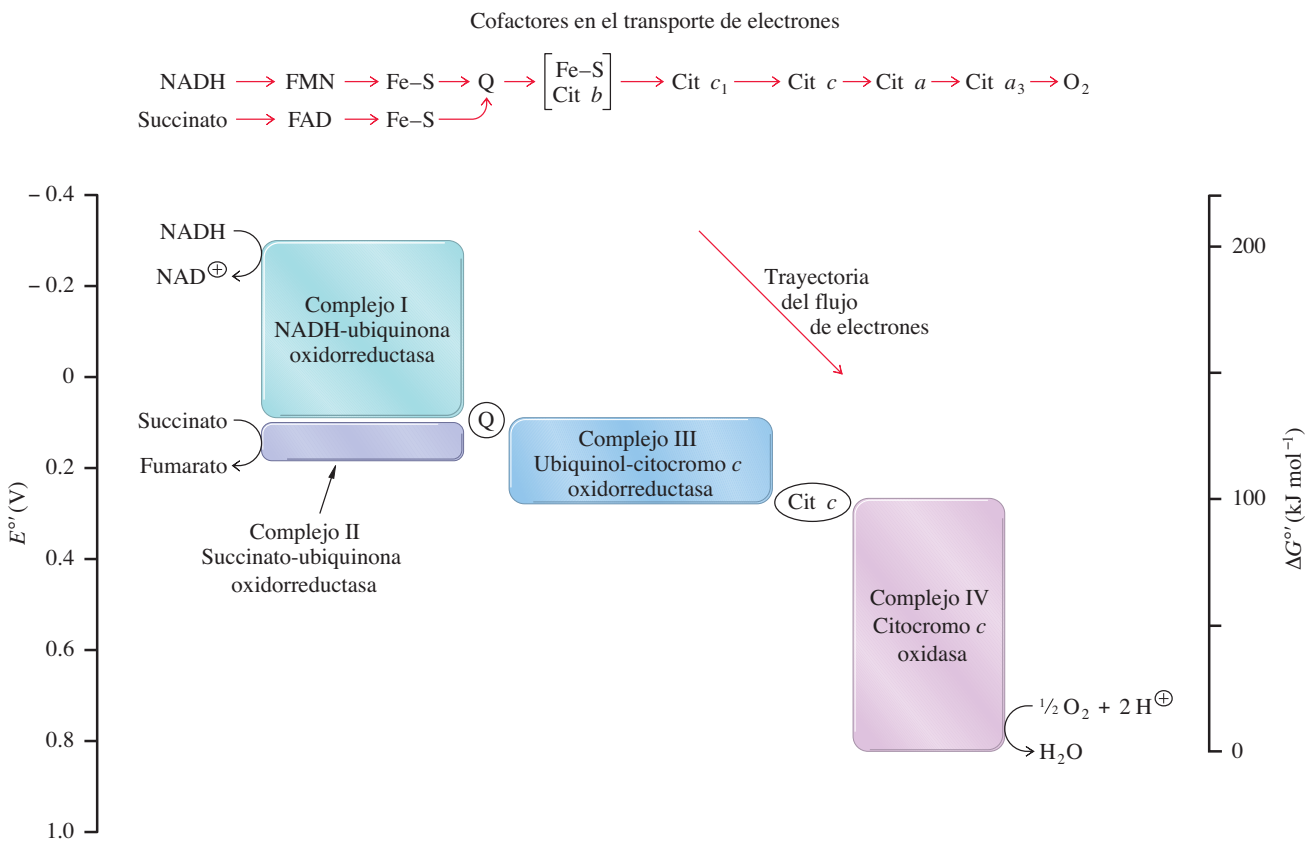


Figura 14.6 ▲
Transporte de electrones. Cada uno de los cuatro complejos de la cadena de transporte de electrones, formados por varias subunidades y cofactores de proteínas, sufren reducción y oxidación cíclica. Los complejos están vinculados por ubiquinona (Q) y citocromo *c*, que son portadores móviles. La altura de cada complejo indica la $\Delta E^{\circ\prime}$ entre su agente reductor (sustrato) y su agente oxidante (que se transforma en el producto reducido).

transporte de electrones con la generación de una fuerza protonmotriz es lo que distingue al transporte de electrones asociado a membrana de otros ejemplos de transporte de electrones.

Los valores que se ven en la figura 14.6 sólo son estrictamente válidos bajo condiciones estándar, cuando la temperatura es 25 °C, el pH es 7.0 y las concentraciones de reactivos y productos son iguales (1 M en cada uno). La relación entre los potenciales reales de reducción (E) y los estándar ($E^{\circ\prime}$) se parece a la relación entre la energía libre real y la estándar (sección 1.4B).

$$E = E^{\circ\prime} + \frac{RT}{n\mathcal{F}}\ln\frac{[S_{red}]}{[S_{ox}]} = E^{\circ\prime} + \frac{2.303RT}{n\mathcal{F}}\log\frac{[S_{red}]}{[S_{ox}]} \qquad \textbf{(14.8)}$$

donde $[S_{red}]$ y $[S_{ox}]$ representan las concentraciones reales de los dos estados de oxidación del portador de electrones. Bajo condiciones estándar, las concentraciones de las moléculas de portador reducido y oxidado son iguales, y entonces la relación $[S_{red}]/[S_{ox}]$ es 1, y el segundo término de la ecuación 14.8 es cero. En este caso, el potencial real de reducción es igual al potencial estándar de reducción (a 25 °C y pH = 7.0). Para que los portadores de electrones se reduzcan y se vuelvan a oxidar, en forma eficiente y lineal, deben estar presentes cantidades apreciables de ambos en las formas reducida y oxidada, bajo condiciones de estado estable. Este es el caso que se encuentra en las mitocondrias. Por consiguiente, se puede afirmar que para cualquier reacción dada de óxido-reducción en los complejos de transporte de electrones, las concentraciones de los dos estados de oxidación de los portadores de electrones son bastante parecidas. Como el pH fisiológico es cercano a 7 bajo la mayor parte de las circunstancia, y como la mayor parte de los procesos de transporte de electrones funcionan a temperaturas cercanas a 25 °C, podrá suponerse, con seguridad, que E no difiere mucho de $E^{\circ\prime}$. En adelante, la descripción sólo se referirá a valores de $E^{\circ\prime}$.

Los potenciales de reducción estándar de los sustratos y cofactores de la cadena de transporte de electrones se ven en la tabla 14.1. Nótese que los valores van de negativo a positivo, de modo que en general cada sustrato o producto intermedio se oxida por un cofactor o sustrato que tiene un $E^{\circ\prime}$ más positivo. De hecho, una consideración para determinar el orden real de los portadores de electrones fue la de sus potenciales de reducción.

La energía libre de Gibbs estándar disponible de las reacciones catalizadas por cada complejo se muestra en la tabla 14.2. La energía libre total es -219 kJ mol^{-1}, como se observa en la figura 14.6. Los complejos I, III y IV traslocan a los protones a través de la membrana, cuando los electrones pasan por el complejo. El complejo II, que también es el complejo de succinato deshidrogenasa que se examina como parte del ciclo del ácido cítrico, no contribuye en forma directa a la formación del gradiente de concentración de protones. El complejo II transfiere electrones desde el succinato a Q, y con ello representa un tributario de la cadena respiratoria.

TABLA 14.1 Potenciales de reducción estándar para componentes mitocondriales de óxido-reducción

Sustrato o complejo	$E^{\circ\prime}$ (V)
NADH	−0.32
Complejo I	
FMN	−0.30
Grupos Fe-S	−0.25 a −0.05
Succinato	+0.03
Complejo II	
FAD	0.0
Grupos Fe-S	−0.26 a 0.00
QH_2/Q	+0.04
($\cdot Q^{\ominus}/Q$	−0.16)
($QH_2/\cdot Q^{\ominus}$	+0.28)
Complejo III	
Citocromo b_L	−0.01
Citocromo b_H	+0.03
Grupo Fe-S	+0.28
Citocromo c_1	+0.22
Citocromo c	+0.23
Complejo IV	
Citocromo a	+0.21
Cu_A	+0.24
Citocromo a_3	+0.39
Cu_B	+0.34
O_2	+0.82

TABLA 14.2 Energía libre estándar producida en la reacción de oxidación catalizada por cada complejo

Complejo	$E^{\circ\prime}_{\text{reductor}}$ (V)	$E^{\circ\prime}_{\text{oxidante}}$ (V)	$\Delta E^{\circ\prime}$ [a] (V)	$\Delta G^{\circ\prime}$ [b] (kJ mol^{-1})
I (NADH/Q)	−0.32	+0.04	+0.36	−70
II (Succinato/Q)	+0.03	+0.04	+0.01	−2
III (QH_2/Citocromo c)	+0.04	+0.23	+0.19	−37
IV (Citocromo c/O_2)	+0.23	+0.82	+0.59	−110

[a] $\Delta E^{\circ\prime}$ se calculá como la diferencia entre $E^{\circ\prime}_{\text{reductor}}$ y $E^{\circ\prime}_{\text{oxidante}}$.

[b] La energía libre estándar obtenida por la oxidación de un molde de NADH o de electrones derivados de NADH se calculó con la ecuación 14.7, con $n = 2$ electrones.

B. Cofactores en el transporte de electrones

Como se muestra en la parte superior de la figura 14.6, los electrones que pasan por los complejos I a IV en realidad se transfieren entre cofactores acoplados. Los electrones entran a la cadena de transporte asociada a membrana de dos en dos, desde los sustratos reducidos NADH y succinato. Las coenzimas de flavina FMN y FAD se reducen en los complejos I y II, respectivamente. Las coenzimas reducidas $FMNH_2$ y $FADH_2$ donan un electrón cada vez, y todos los pasos siguientes de la cadena de transporte de electrones se efectúan con transferencias de un electrón. Los grupos de hierro-azufre (Fe-S) de los tipos [2 Fe-2 S] y [4 Fe-4 S] existen en los complejos I, II y III. Cada grupo de hierro-azufre puede aceptar o donar un electrón, cuando un átomo de hierro sufre reducción y oxidación entre los estados férrico [Fe^{3+}, Fe(III)] y ferroso [Fe^{2+}, Fe(II)]. También los iones cobre y los citocromos son agentes de óxido-reducción para un electrón.

En los complejos enzimáticos mitocondriales de los mamíferos se han encontrado varios citocromos. Entre ellos, citocromo b_L, citocromo b_H, citocromo c_1, citocromo a y citocromo a_3. En otras especies existen citocromos muy similares. Los citocromos transfieren electrones desde un agente reductor hasta un agente oxidante, en forma cíclica entre los estados de oxidación férrico y ferroso de los átomos de hierro en sus grupos prostéticos hemo. Los citocromos individuales tienen distintos potenciales de reducción por las diferencias de estructura en sus apoproteínas, y a veces de sus grupos hemo (tabla 14.1). Las diferencias permiten que los grupos hemo funcionen como portadores de electrones en varios puntos de la cadena de transporte de electrones. En forma parecida, los potenciales de reducción de los grupos de hierro-azufre pueden variar mucho, dependiendo del ambiente proteínico local.

Los complejos de transporte de electrones asociados a membrana se vinculan en sus funciones por los portadores móviles de electrones ubiquinona (Q) y citocromo *c*. La Q es una molécula liposoluble que puede aceptar y donar dos electrones, uno por uno. Q se difunde en el interior de la bicapa lípida, y acepta electrones de los complejos I y II, pasándolos al complejo III. El otro portador móvil de electrones es el citocromo *c*, proteína periférica asociada a la cara externa de la membrana. El citocromo *c* lleva electrones del complejo III al complejo IV. Las estructuras y las reacciones de óxido-reducción de cada uno de estos cuatro complejos de transporte de electrones se examinarán con detalle en las secciones 14.5 a 14.8.

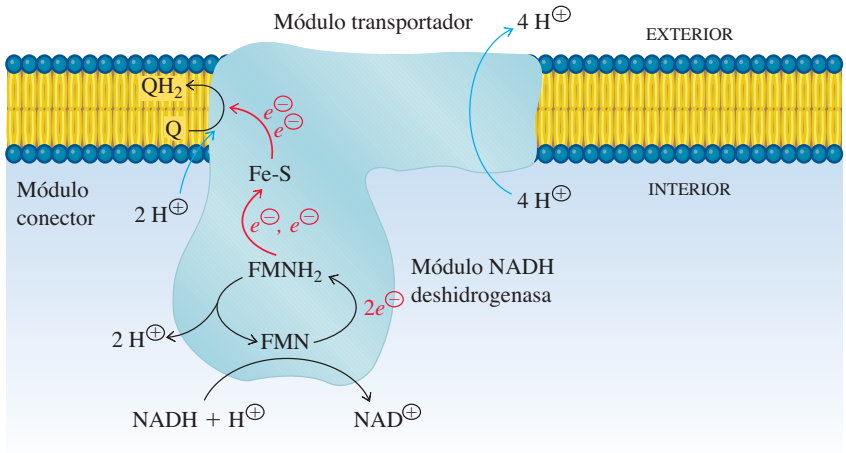
14.5 Complejo I

El complejo I cataliza la transferencia de dos electrones desde NADH hasta Q. El nombre sistemático de esta enzima es NADH:ubiquinona oxidorreductasa. Es una enzima muy complicada. Sus versiones procarióticas contienen 14 cadenas diferentes de polipéptidos. Las formas eucarióticas tienen 14 subunidades homólogas, más otras 20 a 32 subunidades, dependiendo de la especie. Es probable que las subunidades eucarióticas adicionales estabilicen al complejo y eviten fugas de electrones.

La estructura del complejo tiene forma de L (figura 14.7). El componente unido a la membrana consiste en subunidades múltiples que se extienden por la membrana. Este módulo contiene una actividad transportadora de protones. Un componente mayor entra a la matiz mitocondrial, o al citoplasma en las bacterias. Este brazo contiene una actividad terminal de NADH deshidrogenasa y FMN. El módulo conector está formado por subunidades múltiples con ocho o nueve grupos de Fe-S.

Las moléculas de NADH en la superficie interna de la membrana donan electrones al complejo I. Los electrones se pasan de dos en dos así como union hidruro ($H^{\ominus}$, dos electrones y un protón). En el primer paso de la transferencia de electrones, el ion hidruro es transferido a FMN y se forma $FMNH_2$. A continuación se oxida el $FMNH_2$ en dos pasos a través de una semiquinona intermedia. Los dos electrones son transferidos uno por uno al siguiente agente oxidante, un grupo de hierro-azufre.

$$\text{FMN} \xrightarrow{+H^{\oplus},\,+H^{\ominus}} \text{FMNH}_2 \xrightarrow{-H^{\oplus},\,-e^{\ominus}} \text{FMNH}\cdot \xrightarrow{-H^{\oplus},\,-e^{\ominus}} \text{FMN} \qquad \textbf{(14.9)}$$



◀Figura 14.7
Transferencia de electrones y flujo de protones en el complejo I. Los electrones pasan de NADH a Q a través de FMN y una serie de grupos Fe-S. La reducción de Q a QH_2 requiere dos protones tomados del compartimento interno. Además, se traslocan cuatro protones a través de la membrana por cada par de electrones transferidos.

El FMN es un transductor que convierte la transferencia de dos electrones desde las deshidrogenasas unidas a NAD en la transferencia de un electrón para el resto de la cadena de transporte de electrones. En el complejo I, el cofactor $FMNH_2$ transfiere electrones a grupos de hierro-azufre enlazados en secuencia. Hay al menos ocho grupos de Fe-S colocados dentro del mismo brazo del complejo I que contiene la actividad de la NADH deshidrogenasa. Los grupos de Fe-S proporcionan un canal para electrones que los dirige hacia la parte del complejo enlazada a la membrana, donde la ubiquinona (Q) acepta electrones, uno por uno, que pasan por un anión intermedio de semiquinona ($\bullet Q^{\ominus}$) antes de llegar a su estado totalmente reducido, el ubiquinol (QH_2).

$$Q \xrightarrow{+e^{\ominus}} \bullet Q^{\ominus} \xrightarrow{+e^{\ominus},\ +2\,H^{\oplus}} QH_2 \qquad \textbf{(14.10)}$$

Q y QH_2 son cofactores liposolubles. Permanecen dentro de la bicapa lípida y pueden difundirse libremente en dos dimensiones. El sitio de unión de Q en el complejo I está dentro de la membrana. Una de las razones para la complicada cadena de transporte de electrones dentro del complejo I es llevar electrones desde un ambiente acuoso a un ambiente hidrofóbico en el interior de la membrana.

A medida que los electrones atraviesan el complejo I, se transfieren dos protones (uno que se origina en el ion hidruro del NADH y otro del interior) al FMN para formar $FMNH_2$. Estos dos protones, o sus equivalentes, se consumen en la reducción de Q a QH_2. Así, se toman dos protones del interior y se transfieren a la QH_2. No se liberan al exterior en las reacciones del complejo I. (Después, la QH_2 se vuelve a oxidar por el complejo III, y entonces los protones son liberados al exterior. Esta es parte de la actividad de traslocación de protones del complejo III, que se describirá en la sección 14.7).

En el complejo I, hay cuatro protones traslocados a través de la membrana por cada par de electrones que pasan de NADH a QH_2. Éstos *no* incluyen a los protones que se requieren en la reducción de ubiquinona. Es probable que la bomba de protones sea un antiportador de $H^{\oplus}/Na^{\oplus}$ ubicado en el módulo unido a la membrana. No es claro el mecanismo de traslocación de protones; es probable que se acople a cambios de conformación en la estructura del complejo I, a medida que los electrones pasan del sitio de la NADH deshidrogenasa al sitio de unión de ubiquinona.

14.6 Complejo II

El complejo II es la succinato:ubiquinona oxidorreductasa, y también se llama complejo de succinato deshidrogenasa. Es la misma enzima que la mencionada en el capítulo anterior (sección 13.3, parte 6). Cataliza una de las reacciones del ciclo del ácido cítrico. El complejo II acepta electrones de succinato, e igual que el complejo I, cataliza la reducción de Q a QH_2.

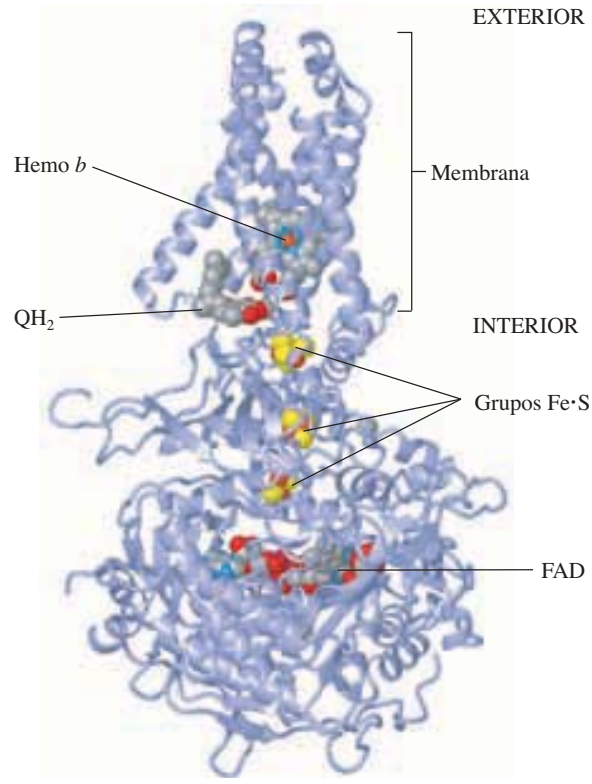


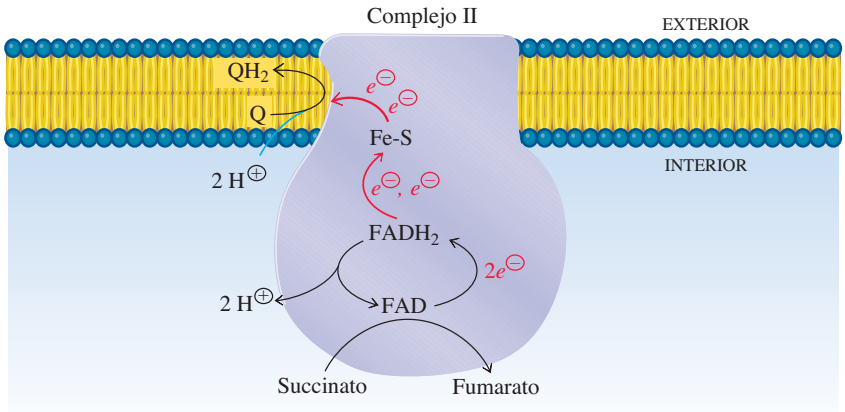
Figura 14.8 ▶
Estructura del complejo de succinato deshidrogenasa en *E. coli*. Una sola copia de la enzima muestra las posiciones de FAD, los tres grupos Fe-S, QH_2 y el grupo hemo *b*. El complejo II contiene tres copias de esta enzima de varias subunidades. [PDB 1NEK]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

El complejo II contiene tres enzimas multisubunidad idénticas, que se asocian para formar una estructura trimérica que está firmemente incrustada en la membrana (figura 14.8). Su forma general se parece a un hongo con su cabeza (el "sombrerillo") entrando al interior del compartimiento de la membrana. Cada una de las tres enzimas succinato deshidrogenasa tiene dos subunidades que forman la cabeza, y una o dos subunidades (dependiendo de la especie) que forman el tallo (el "pie" del hongo) unido a la membrana. Una de las subunidades de la cabeza contiene el sitio de unión con el sustrato, y una flavina adenina dinucleótido (FAD, *flavin adenine dinucleotide*) unida en forma covalente. La otra subunidad de la cabeza contiene tres grupos Fe-S.

Las subunidades de la cabeza en todas las especies tienen una relación estrecha, y comparten una importante similitud de secuencia con otros miembros de la familia de succinato deshidrogenasa (p. ej., fumarato reductasa, sección 14.13). Las subunidades de membrana, por otra parte, pueden ser muy diferentes (y no relacionadas) en varias especies. En general, el componente de la membrana tiene una o dos subunidades formadas exclusivamente por α-hélices que abarcan la membrana. La mayor parte de ellas tienen una molécula unida de hemo *b*, y a esta subunidad se le llama con frecuencia citocromo *b*. Todas las subunidades de membrana tienen un sitio de unión de Q colocado cerca de la superficie interna de la membrana, en el punto donde las subunidades de cabeza tocan a las subunidades de membrana.

La secuencia de reacciones para la transferencia de dos electrones de succinato a Q comienza con la reducción de FAD por un ion hidruro. A ella le siguen dos transferencias de un electrón, de la flavina reducida a la serie de tres grupos de hierro-azufre (figura 14.9). (En las especies que tienen un ancla de citocromo *b*, el grupo hemo no es parte de la ruta de transporte de electrones).

En las reacciones catalizadas por el complejo II se libera muy poca energía libre. Eso quiere decir que el complejo no puede contribuir en forma directa al gradiente de concentración de protones a través de la membrana. Más bien suministra electrones de la oxidación de succinato, a medio camino en la secuencia de transporte de electrones. Q puede aceptar electrones del complejo I o II, y donarlos al complejo III, y por consiguiente al resto de la cadena de transporte de electrones. Las reacciones en diversas rutas también ceden electrones a Q. En la sección 14.12 se verá una de ellas, la reacción catalizada por el complejo de glicerol 3-fosfato deshidrogenasa.



◀Figura 14.9
Transferencia de electrones en el complejo II. Un par de electrones pasa del succinato a FAD como parte del ciclo del ácido cítrico. Los electrones son transferidos uno por uno, de $FADH_2$ a tres grupos de Fe-S y después a Q. (Sólo se muestra un grupo Fe-S en la figura). Se toman dos protones del interior para formar QH_2. El complejo II no contribuye directamente al gradiente de concentración de protones, pero sirve como tributario que suministra electrones (como QH_2) al resto de la cadena de transporte de electrones.

14.7 Complejo III

El complejo III es ubiquinol:citocromo *c* oxidorreductasa, que también se llama complejo citocromo *bc*. Esta enzima cataliza la oxidación de moléculas de ubiquinol (QH_2) en la membrana, y la reducción de una molécula móvil e hidrosoluble de citocromo *c* en la superficie externa. El transporte de electrones a través del complejo III se acopla a la transferencia de $H^{\oplus}$ a través de la membrana por un proceso llamado ciclo Q.

Se han resuelto las estructuras de los complejos de citocromo *bc* en muchas especies bacterianas y eucarióticas mediante cristalografía de rayos X. El complejo III contiene dos copias de la enzima, y está firmemente anclado a la membrana por una gran cantidad de α-hélices que abarcan la bicapa lípida (figura 14.10, página siguiente). La enzima funcional está formada por tres subunidades principales: citocromo c_1, citocromo *b* y proteína de hierro-azufre de Rieske (ISP, *iron-sulfur protein*). Hay otras subunidades en la superficie interna, pero no tienen un papel directo en la reacción de la ubiquinol:citocromo *c* oxidorreductasa. El citocromo *c*, aceptor móvil de electrones, se une a la punta de la parte del complejo que está en el lado externo de la membrana. (En los cloroplastos hay complejos muy parecidos, donde participan en el transporte de electrones y traslocación de protones durante la fotosíntesis).

La trayectoria de los electrones a través del complejo se muestra en la figura 14.11, de la página 429. La reacción comienza cuando QH_2 (del complejo I o del complejo II) se une al sitio Q_0 de la subunidad de citocromo *b*. QH_2 se oxida a la semiquinona, y pasa un solo electrón al complejo Fe-S adyacente en la subunidad de ISP. De allí, el electrón se transfiere al grupo hemo del citocromo c_1. Esta transferencia se facilita por el movimiento del grupo de la cabeza de la ISP. En la posición de aceptación de electrones, el grupo de Fe-S es adyacente al sitio Q_0, y en la posición de donación de electrones, ese grupo está cerca del grupo c_1-hemo. El citocromo *c* soluble se reduce por transferencia de un electrón, de la subunidad de citocromo c_1 unido a la membrana, del complejo III.

En esta reacción, el receptor terminal de electrones es el citocromo *c*. Esta molécula sirve como portador móvil de electrones, pasando electrones al complejo IV, el siguiente eslabón de la cadena. El papel del citocromo *c* reducido es parecido al de la QH_2, que lleva electrones del complejo I al complejo III. Las estructuras de los portadores de electrones citocromo *c*, de todas las especies, son notoriamente parecidas (sección 4.7B, figura 4.21) y las secuencias de aminoácidos en la cadena de polipéptidos se conservan bien (sección 3.11, figura 3.23).

La oxidación de la QH_2 en el sitio Q_0 es un proceso de dos etapas, y en cada una se transfiere un solo electrón. La trayectoria de los electrones a partir del segundo paso, oxidación de la semiquinona intermedia, sigue una ruta distinta a la del primer electrón. En este caso, el electrón pasa en secuencia a dos hemo tipo *b* dentro de la parte de la membrana en el complejo. El primer grupo hemo (b_L) tiene menor potencial de reducción, y el segundo hemo (b_H) tiene mayor potencial de reducción (tabla 14.1).

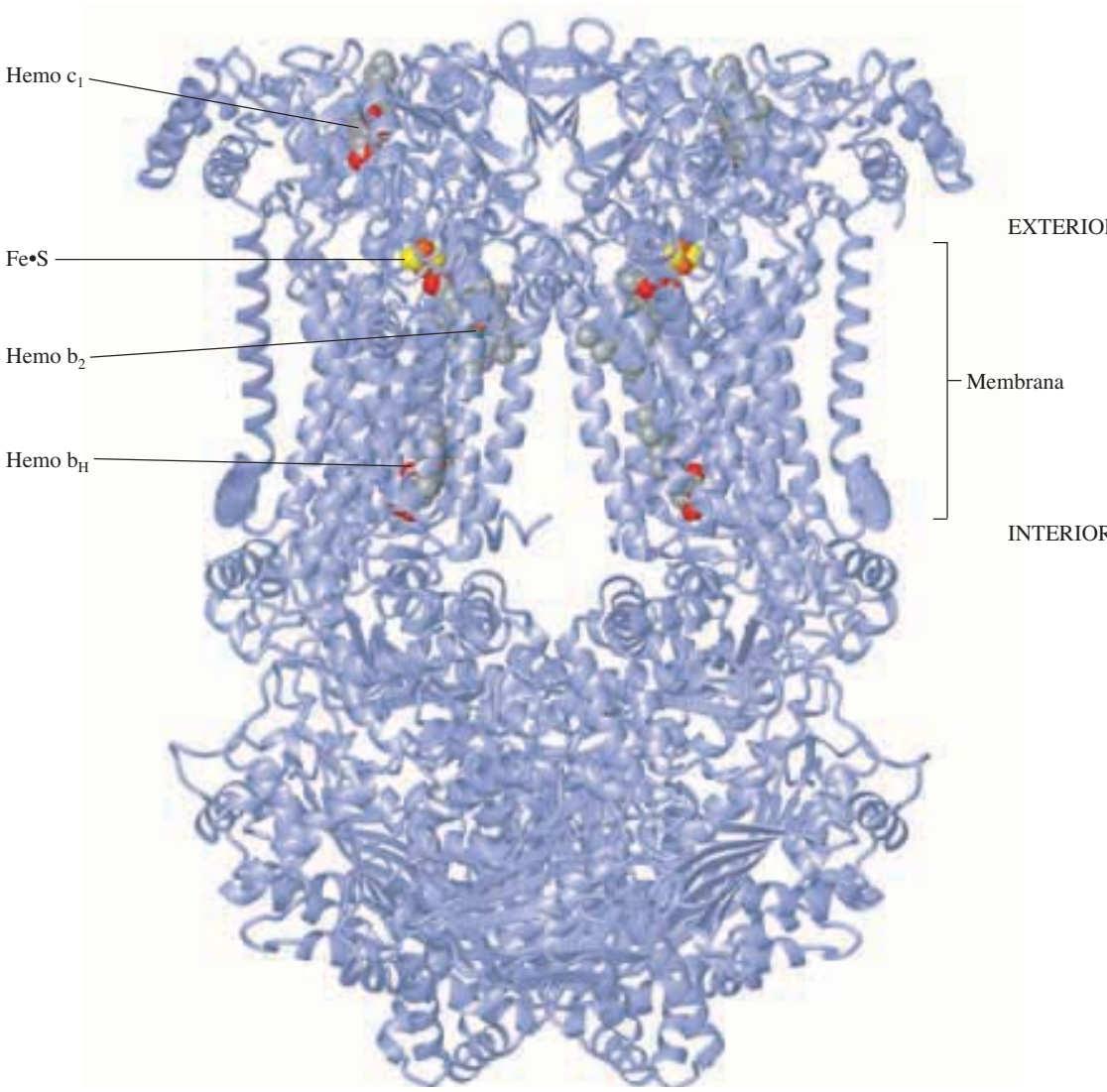
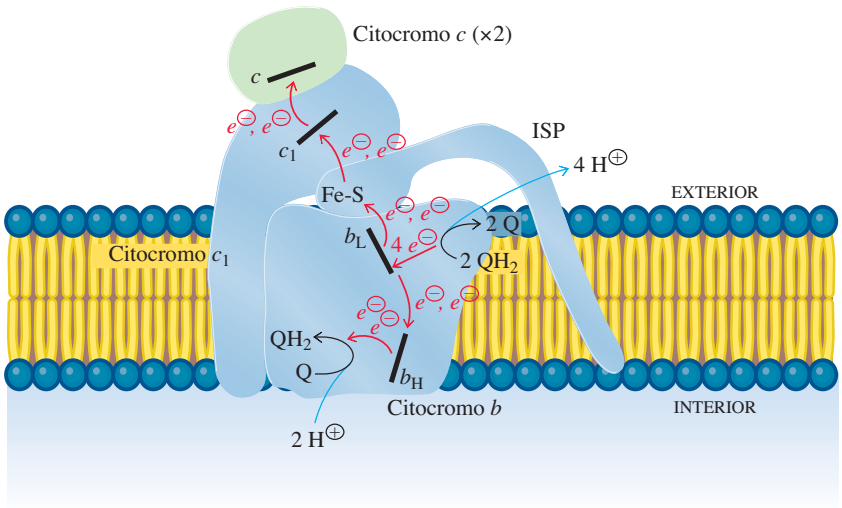


Figura 14.10 ▲
Complejo III de mitocondrias de vaca (*Bos taurus*). El complejo contiene dos copias de la enzima ubiquinona:citocromo *c* oxidorreductasa. [PDB 1PP9]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

El hemo b_H es parte del sitio Q_1, donde se reduce una molécula de Q a QH_2 en una reacción de dos pasos que implica una semiquinona intermedia. Se transporta un solo electrón desde b_L (en el sitio Q_0) a b_H (en el sitio Q_1) y a Q, para producir la semiquinona. Después se transfiere un segundo electrón para reducir la semiquinona a QH_2. El segundo electrón viene de la oxidación de una segunda molécula de QH_2 en el sitio Q_0. La segunda oxidación de QH_2 también da como resultado la reducción de una segunda molécula de citocromo *c*, ya que los dos electrones de la segunda QH_2 van por caminos separados. El resultado neto es que la oxidación de dos moléculas de QH_2 en el sitio Q_0 produce dos moléculas de citocromo *c* reducido y regenera una molécula de QH_2 en el sitio Q_1.

Durante la oxidación de dos moléculas de QH_2 en el sitio Q_0 se producen cuatro protones. Esos protones son liberados al exterior del compartimiento de la membrana, y contribuyen al gradiente de protones que se forma durante el transporte de electrones asociado a membrana. Los protones se originan en el compartimiento interior. Quizá hayan sido tomados en las reacciones catalizadas por el complejo I o el complejo II, o



◀ Figura 14.11
Transferencia de electrones y flujo de protones en el complejo III. Dos pares de electrones pasan por separado desde dos moléculas de QH_2 al hemo b_L (sitio de Q_0). Cada par de electrones se divide para que los electrones individuales vayan por rutas separadas. Un electrón es transferido a un grupo Fe-S, al citocromo c_1 y por último al citocromo *c*, al aceptor terminal de electrón. El otro electrón de cada par es transferido al hemo b_H (sitio de Q_1) y después a Q. Un total de cuatro protones se traslocan a través de la membrana: dos del compartimiento interno y dos de QH_2.

se pudieron haber derivado de protones tomados en el interior de la membrana durante reducción de Q en el sitio Q_1 del complejo III, como se muestra en la figura 14.11.

El mecanismo de traslocación de protones se llama ciclo Q. La estequiometría de la reacción completa es la siguiente:

$$Q_0: \quad 2\,QH_2 + 2\,\text{cit}\,c(Fe^{3+}) \longrightarrow 2\,Q + 2\,\text{cit}\,c(Fe^{2+}) + 2\,e^{\ominus} + 4\,H^{\oplus}_{ext}$$

$$Q_1: \quad Q + 2\,H^{\oplus}_{int} + 2\,e^{\ominus} \longrightarrow QH_2$$

$$QH_2 + 2\,\text{cit}\,c(Fe^{3+}) + 2\,H^{\oplus}_{int} \longrightarrow Q + 2\,\text{cit}\,c(Fe^{2+}) + 4\,H^{\oplus}_{ext} \qquad \textbf{(14.11)}$$

Así, para cada par de electrones que pasa por el complejo III, desde QH_2 al citocromo *c*, hay cuatro protones traslocados a través de la membrana. Se reducen dos moléculas de citocromo *c*, y esos portadores móviles transportan a un electrón, cada uno, al complejo IV. Nótese que en realidad hay dos moléculas de QH_2 que se oxidan (cediendo cuatro electrones), pero dos de esos electrones se reciclan y regeneran una molécula de QH_2.

La reacción completa catalizada por la ubiquinona:citocromo *c* oxidorreductasa (el complejo III) incluye al ciclo Q y la traslocación de protones a través de la membrana. Se puede decir que esta reacción es una de las más importantes y fundamentales en todo el metabolismo.

14.8 Complejo IV

El complejo IV es la citocromo *c* oxidasa. Este complejo cataliza la oxidación de moléculas de citocromo *c* reducido producidas por el complejo III. En la reacción se incluye una reducción, con cuatro electrones, del oxígeno molecular (O_2) para formar agua ($2\,H_2O$), y la traslocación de cuatro protones a través de la membrana.

El complejo IV contiene dos unidades funcionales de citocromo *c* oxidasa. En todas las especies, cada citocromo *c* oxidasa contiene copias sencillas de las subunidades I, II y III (figura 14.12, página siguiente). Las enzimas bacterianas sólo contienen una subunidad adicional en cada unidad funcional. Las enzimas (mitocondriales) eucarióticas tienen hasta diez subunidades adicionales. La masa total del complejo IV en los mamíferos es mayor que 400 kDa. Otras subunidades en los complejos eucarióticos tienen un papel en el armado del complejo IV, y en la estabilización de la estructura.

La estructura interna de la citocromo *c* oxidasa se forma a partir de tres subunidades conservadas: I, II y III. Estos polipéptidos son codificados por genes mitocondriales

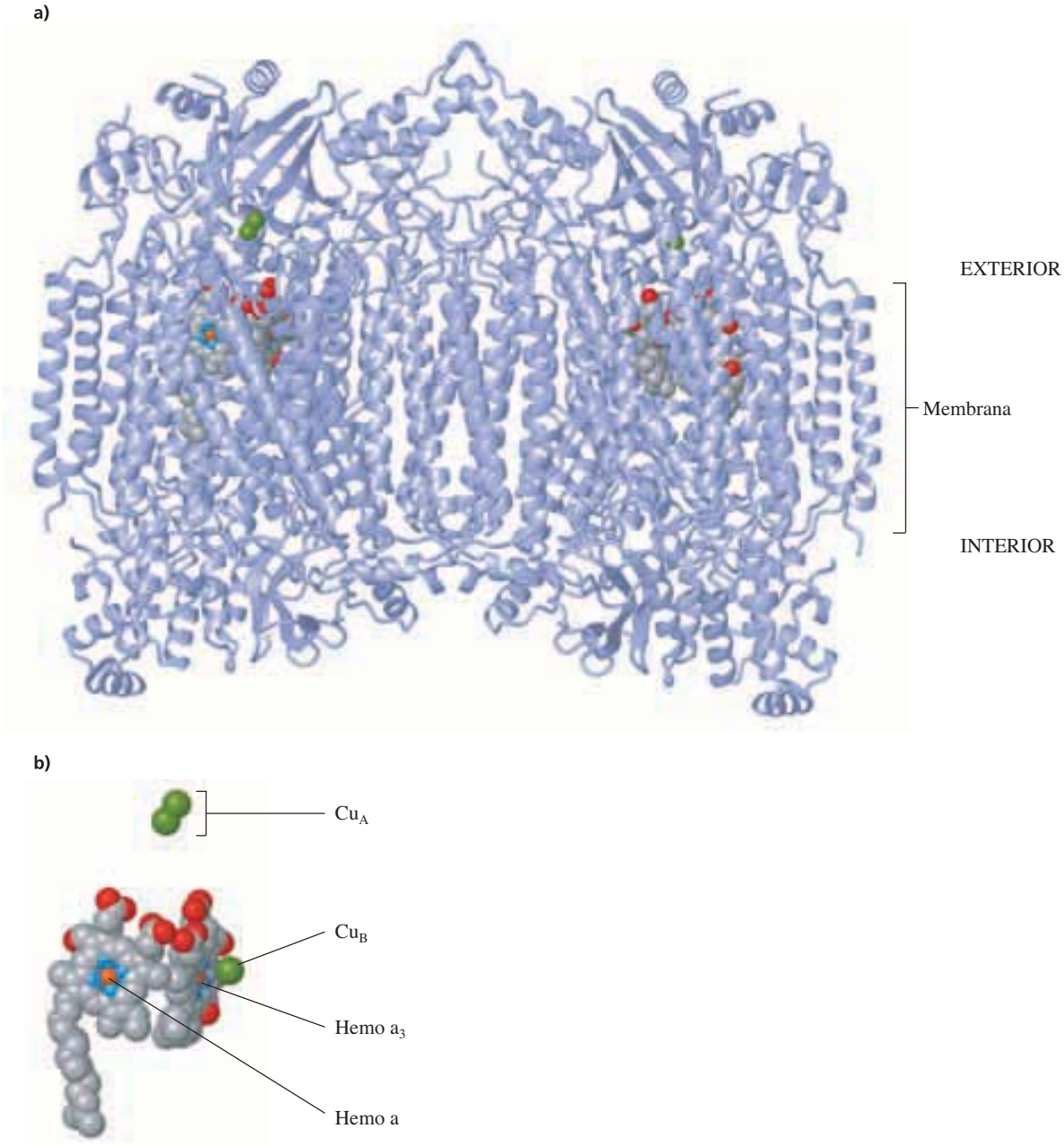


Figura 14.12 ▲
Estructura del complejo IV de vaca (*Bos taurus*) en las mitocondrias. **a)** El complejo IV está formado por dos unidades funcionales de citocromo *c* oxidasa. Cada unidad está formada por 13 subunidades con múltiples α-hélices que abarcan a la membrana. **b)** Organización de los cofactores hemo y cobre en una de las unidades de citocromo *c* oxidasa. [PDB 1OCC]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

en todos los eucariotas. La subunidad I está casi totalmente embebida en la membrana. El grueso de este polipéptido consiste en 12 α hélices que atraviesan la membrana. Hay tres centros redox sepultados dentro de la subunidad I, dos de ellos son hemos tipo *a* (hemo-*a* y hemo-a_3), y el tercero es un átomo de cobre (Cu_B). El átomo de cobre está muy cerca del átomo de hierro del hemo-a_3 y forma un centro binuclear donde se efectúa la reducción del oxígeno molecular.

La subunidad II tiene dos hélices que atraviesan la membrana y la anclan en ella. La mayor parte de la cadena de polipéptido forma un dominio en barril-β que está en la

superficie exterior de la membrana. Este dominio contiene un centro redox de cobre (Cu_A) formado por dos átomos de cobre. Estos dos átomos de cobre comparten electrones y forman un estado mixto de valencia. El dominio externo de la subunidad II es el sitio donde el citocromo *c* se une a la citocromo *c* oxidasa.

La subunidad III tiene siete hélices transmembrana y está embebida por completo en ella. En la subunidad III no hay centros redox, y puede removerse artificialmente sin perder actividad catalítica. Su papel *in vivo* es estabilizar las subunidades I y II, y ayudar a proteger a los centros de redox contra reacciones óxido-reducción inadecuadas.

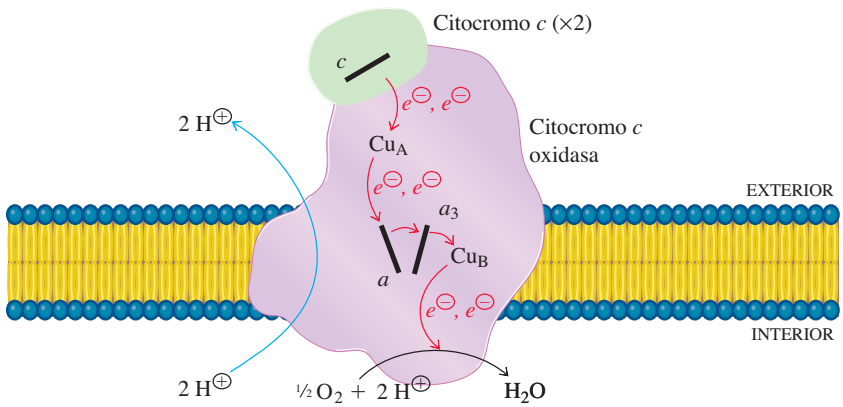
La figura 14.13 muestra la secuencia de transferencias electrónicas en el complejo IV. El citocromo *c* se une a la subunidad II y transfiere un electrón al sitio Cu_A. El par de átomos de cobre en ese sitio puede aceptar y donar un electrón cada vez, en forma muy parecida a un grupo de Fe-S. La reducción completa de O_2 requiere cuatro electrones. Así, cuatro moléculas de citocromo *c* deben unirse y transferir, uno tras otro, un solo electrón, cada uno al centro redox Cu_A.

Los electrones se transfieren uno tras otro del sitio Cu_A al grupo prostético hemo *a* en la subunidad I. De allí se transfieren al centro binuclear hemo a_3-Cu_B. Los dos grupos hemo (*a* y a_3) tienen estructuras idénticas, pero difieren en sus potenciales de reducción estándar debido al microambiente local formado por las cadenas laterales de aminoácido que los rodean en la subunidad I. Los electrones se pueden acumular en el centro binuclear cuando el hierro de hemo alterna entre los estados Fe^{4+}, Fe^{3+} y Fe^{2+}, y el átomo de cobre pasa de Cu^{2+} a Cu^{+}. El mecanismo detallado de la reducción de oxígeno molecular en el centro binuclear es objeto de activas investigaciones en varios laboratorios. El primer paso consiste en la descomposición rápida del oxígeno molecular. Un átomo de oxígeno se une al átomo de hierro del grupo de hemo a_3 y el otro se une al átomo de cobre. La protonación que sigue, y la transferencia de electrón, da como resultado la liberación de una molécula de agua del sitio del cobre, seguida por la liberación de una segunda molécula de agua del ligando de hierro. La reacción total requiere la toma de cuatro protones de la superficie interna de la membrana.

$$O_2 + 4\,e^- + 4\,H^+_{int} \longrightarrow 2\,H_2O \qquad \textbf{(14.12)}$$

Las reacciones de la citocromo *c* oxidasa se acoplan a la transferencia de protones a través de la membrana. Un protón se trasloca por cada electrón que pasa del citocromo *c* al producto final (H_2O). Los protones se mueven por un canal en el complejo IV y ese movimiento está impulsado por cambios de conformación en la enzima cuando se reduce el oxígeno. La estequiometría de la reacción completa catalizada por el complejo IV es

$$4\ \text{cit}\ c^{2+} + O_2 + 8\,H^+_{int} \longrightarrow 4\ \text{cit}\ c^{3+} + 2\,H_2O + 4\,H^+_{ext} \qquad \textbf{(14.13)}$$



◀Figura 14.13
Transferencia de electrones y flujo de protones en el complejo IV. Los átomos de hierro de los grupos hemo en los citocromos, y los átomos de cobre, se oxidan y reducen cuando pasan electrones del citocromo *c* al agua. El transporte de electrones a través del complejo IV se acopla a la transferencia de protones a través de la membrana. El diagrama muestra la estequiometría para la transferencia de un par de electrones, como en las figuras 14.7, 14.9 y 14.11. La reacción real consiste en la transferencia de cuatro electrones a una molécula de O_2 para formar dos moléculas de agua.

El complejo IV contribuye al gradiente de protones que impulsa la síntesis de ATP. Se traslocan *dos* protones por cada *par* de electrones que pasan por este complejo. Recuérdese que el complejo I transfiere cuatro protones por cada par de electrones, y que el complejo III también trasloca cuatro protones por cada par de electrones. Entonces, por cada molécula de NADH que se oxida, el sistema de transporte de electrones asociado a membrana bombea diez protones, que atraviesan la membrana.

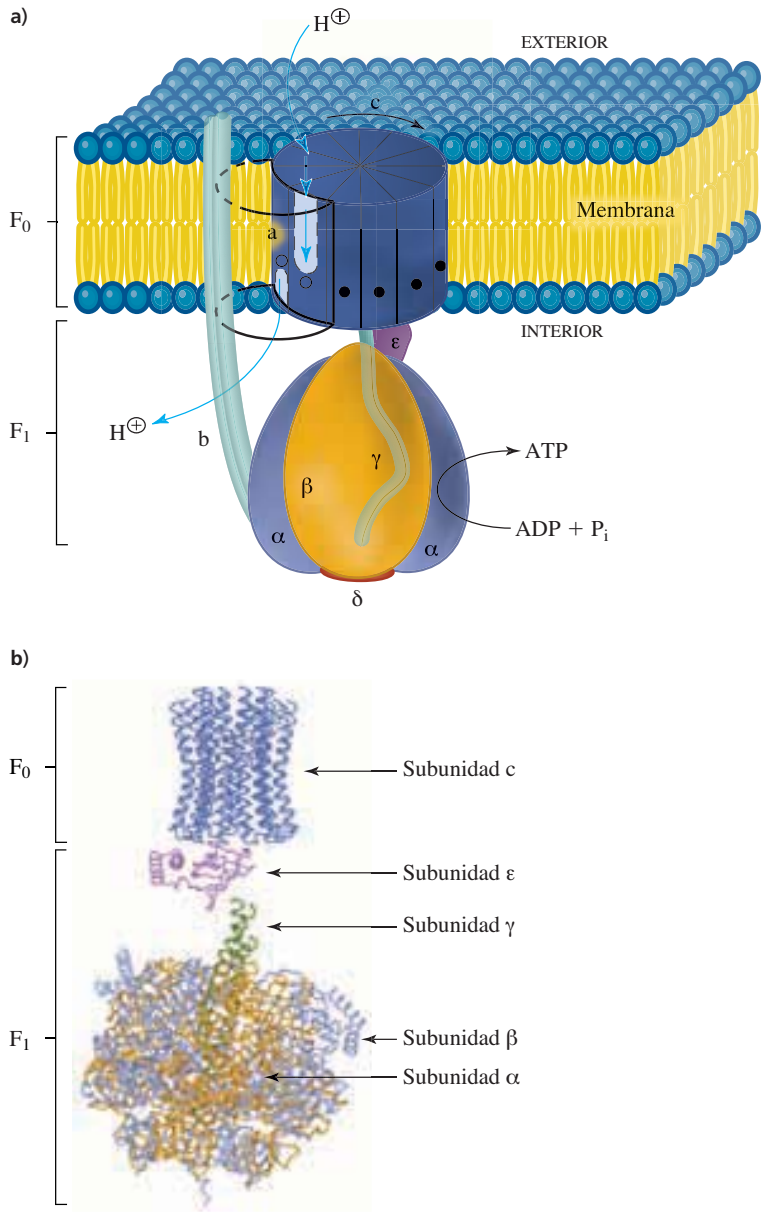
14.9 Complejo V: ATP sintasa

El complejo V es la ATP sintasa. Cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP + P_i en una reacción impulsada por el gradiente de protones generado durante el transporte de electrones asociado a membrana. La ATP sintasa es una ATPasa específica de tipo F, llamada F_0F_1 ATPasa, y su nombre es por la reacción contraria. A pesar de su nombre, las ATPasas tipo F son responsables de sintetizar el ATP, no de hidrolizarlo. Están enlazadas a la membrana, y tienen una estructura característica de manija y tallo (o "pomo y vara", como en las puertas) (figura 14.14). El componente F_1 (la manija) contiene las subunidades catalíticas. Cuando se libera de las preparaciones de membranas, el componente F_1 cataliza la hidrólisis de ATP. Por esta razón se le ha llamado F_1 ATPasa, por tradición. Esta parte de la enzima se mete a la matriz mitocondrial en los eucariotas, y al citoplasma en las bacterias. (También se encuentra ATP sintasa en las membranas de cloroplastos, como se verá en el capítulo siguiente). El componente F_0 (el tallo) está embebido en la membrana. Tiene un canal de protones que atraviesa la membrana. El paso de protones por el canal, del exterior de la membrana al interior, se acopla a la formación de ATP por el componente F_1.

La composición de la subunidad en el componente F_1 es $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ y la del componente F_0 es $a_1b_2c_{10-14}$. Las subunidades de F_0 interactúan formando una base cilíndrica dentro de la membrana. El núcleo de la estructura F_1 (manija) está formado por tres copias de cada una de las subunidades α y β dispuestas como un hexámero cilíndrico. Los sitios de unión de nucleótido están en las hendiduras que hay entre las subunidades α y β adyacentes. Así, los sitios de unión están a 120° de distancia sobre la superficie del cilindro $\alpha_3\beta_3$. El sitio catalítico de la síntesis de ATP se asocia principalmente a residuos de aminoácido en la subunidad β.

El oligómero $\alpha_3\beta_3$ de F_1 está conectado a las subunidades c que atraviesan a la membrana por un tallo multisubunidades formado por las subunidades γ y ε. La unidad c-ε-γ forma un "rotor" que gira dentro de la membrana. La rotación de la subunidad γ dentro del hexámero $\alpha_3\beta_3$ altera la conformación de las subunidades, abriendo y cerrando los sitios activos. Las subunidades a, b y δ forman un brazo que también enlaza al componente F_0 con el oligómero $\alpha_3\beta_3$. Esta unidad a-b-δ-$\alpha_3\beta_3$ se llama "estator." El paso de protones por el canal en la interfase entre las subunidades a y c hace que el conjunto del rotor gire en una dirección, en relación con el estator. A toda la estructura se le suele llamar motor molecular.

Hay de 10 a 14 subunidades c en el anillo c asociado a membrana, en la base del rotor. La cantidad de subunidades depende de la especie; las levaduras y *E. coli* tienen un anillo con 10 subunidades, pero las plantas y los animales tienen hasta 14 subunidades. Hay buenas razones que indican que la rotación de cada subunidad c por el estator está impulsada por la traslocación de un solo protón. La rotación de la subunidad γ dentro del componente F_1 se efectúa en forma escalonada y agitada, donde cada escalón es 120° de rotación. Cuando gira el anillo c, tuerce al eje γ hasta que se acumula la suficiente tensión para hacerlo saltar a la siguiente posición dentro del hexámero $\alpha_3\beta_3$. Si el anillo c tiene 10 subunidades, entonces una vuelta completa necesita de la traslocación de 10 protones y da como resultado la producción de tres moléculas de ATP. La estequiometría exacta todavía se está deduciendo. Los resultados de muchos experimentos indican que, en promedio, deben traslocarse tres protones por cada molécula de ATP sintetizada, y es el valor que se usará en el resto de este libro.



◀ Figura 14.14
Estructura de manija y tallo de la ATP sintasa. **a)** El componente F_1 está en la cara interna de la membrana. El componente F_0, que abarca la membrana, forma un canal de protones en la interfase a-c. El paso de protones por este canal hace que gire el rotor (sombreado) en relación con el estator. El giro de esas rotaciones se transmite a F_1 donde se usa para impulsar la síntesis de ATP. **b)** Estructura molecular del rotor y parte del estator de la ATP sintasa en *Saccharomyces cerevisiae*. El estudio de muchas estructuras moleculares como ésta, basado en cristalografía de rayos X, ayudó a deducir el modelo completo que se ve en (a). [PDB 1QO1]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

El mecanismo de síntesis de ATP a partir de ADP y P_i ha sido el objetivo de investigaciones intensas durante varias décadas. En 1979, Paul Boyer propuso el *mecanismo de cambio de enlazamiento*, basado en observaciones que parecen indicar que las propiedades de unión del sitio activo con sustrato y producto podrían cambiar cuando los protones pasan por la membrana. El oligómero $\alpha_3\beta_3$ de la ATP sintasa contiene tres sitios catalíticos. En determinado momento, cada sitio puede estar en una de tres conformaciones distintas. Las tres conformaciones son: 1) abierta: el ATP recién sintetizado puede ser liberado y se pueden enlazar ADP + P_i; 2) conexión: el ADP + P_i enlazados no se pueden liberar, y 3) estrecha: el ATP está muy fuertemente enlazado, y se favorece la condensación de ADP + P_i. Los tres sitios pasan en secuencia a través de esas conformaciones. Se cree que la formación y la liberación de ATP suceden por los siguientes pasos, resumidos en la figura 14.15 de la página siguiente.

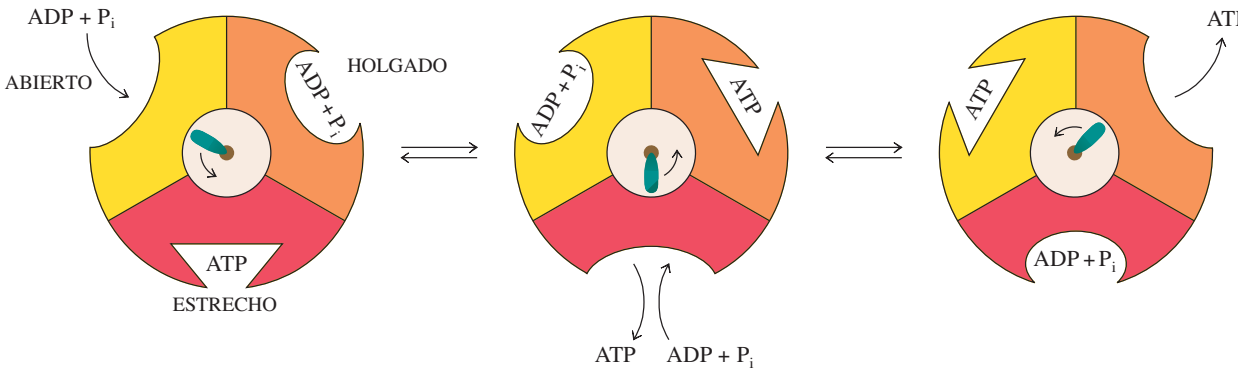


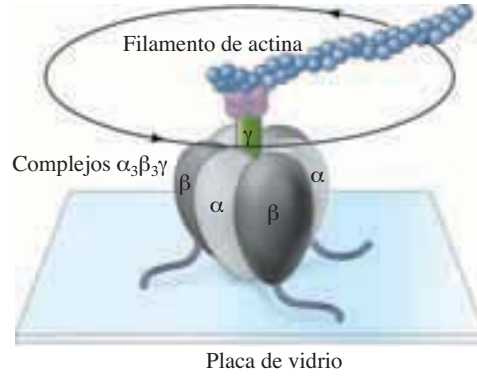
Figura 14.15 ▲
Mecanismo de cambio de enlazamiento en la ATP sintasa. Las diversas conformaciones de los tres sitios catalíticos se indican con formas diferentes. El ADP y el P_i se unen al sitio amarillo en la conformación abierta, cuando el eje γ gira en dirección contraria a las manecillas del reloj (vista del extremo citoplásmico/matriz del componente F_1), el sitio amarillo se convierte en una conformación holgada donde el ADP y el P_i se enlazan con más fuerza. Después del paso siguiente de la rotación, el sitio amarillo se convierte en una conformación estrecha, y se sintetiza ATP. Mientras tanto, el sitio que tenía fuertemente unido al ATP se ha vuelto un sitio abierto, y un sitio holgado que contiene otras moléculas de ADP y P_i transformándose en un sitio estrecho. El ATP es liberado del sitio abierto, y el ATP es sintetizado en el sitio estrecho. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

1. Se unen a un sitio abierto una molécula de ADP y una de Pi.
2. La rotación del eje γ hace que cada uno de los tres sitios catalíticos cambie de conformación. La conformación abierta (que contiene al ADP y al P_i recién enlazados) se transforma en un sitio de conexión. El sitio de conexión, lleno ya con ADP y P_i, se transforma en un sitio estrecho. El sitio estrecho con ATP se convierte en un sitio abierto.
3. El ATP es liberado del sitio abierto, y el ADP y el P_i se condensan para formar ATP en el sitio estrecho.

La máxima evidencia de que la ATP sintasa es un motor que gira se ha obtenido usando el complejo $\alpha_3\beta_3\gamma$ inmovilizado en una placa de vidrio, y modificado por la fijación de un filamento fluorescente de actina (figura 14.16). La rotación de moléculas aisladas se observó por microscopia en presencia de ATP. En este experimento, la subunidad γ marcada gira dentro del oligómero $\alpha_3\beta_3$ como respuesta a la hidrólisis de ATP. Esta rotación es contraria a las manecillas del reloj, como se ve en la figura 14.16. (Giraría con las manecillas del reloj si se viera desde abajo de la placa de vidrio: este es el punto de vista que se ilustra en la figura 14.15). La rotación impulsada por hidrólisis de ATP tiene dirección contraria a la que se observa cuando la rotación es impulsada por el gradiente de protones y se sintetiza ATP. La rotación del eje se hizo en incrementos de 120°, con un paso por cada molécula de ATP hidrolizada. Bajo condiciones ideales, se han observado velocidades de más de 130 revoluciones por segundo. Es la velocidad de rotación esperada de acuerdo con la velocidad observada de hidrólisis de ATP.

El transporte activo por ATPasas se describió en la sección 9.11D.

Figura 14.16 ▶
Demostración de la rotación de una sola molécula de ATP sintasa. Los complejos $\alpha_3\beta_3$ se enlazaron a una placa de vidrio y la subunidad γ se fijó al brazo de proteína fluorescente. Los brazos son moléculas giradas al añadir ATP. [Adaptado de Noji, H., Yasuda, R., Yoshida M. y Kinosita, K., Jr. (1997). Direct observation of rotation of F_1-ATPase. *Nature* 386:299-302].



RECUADRO 14.1 Fugas de protones y producción de calor

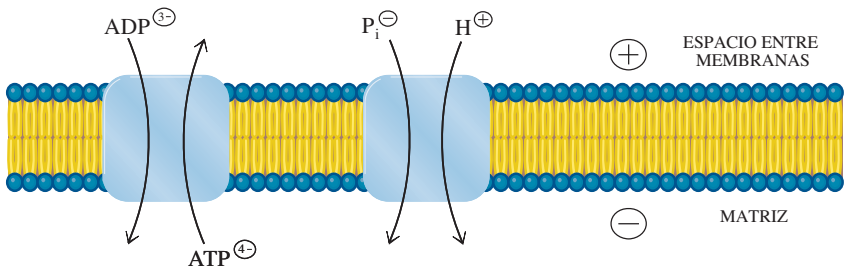
Las fugas de protones parecen ser los principales consumidores de energía libre en los mamíferos. En un mamífero adulto en reposo, 90% del consumo de oxígeno se efectúa en las mitocondrias, y 80% de éste se acopla a la síntesis de ATP. Las estimaciones cuantitativas indican que el ATP producido por las mitocondrias se usa para sintetizar proteínas (casi 30% del ATP disponible), para el transporte activo de iones por la $Na^{\oplus}$—$K^{\oplus}$ ATPasa y la Ca^{2+} ATPasa (25 a 35%), para gluconeogénesis (hasta 10%) y para otros procesos metabólicos, incluyendo la generación de calor. Una cantidad importante de la energía procedente de la oxidación no se usa en la síntesis de ATP. En los mamíferos en reposo, al menos 20% del oxígeno consumido por las mitocondrias se desacopla por la fuga de protones mitocondrial. Esta fuga produce calor en forma directa, sin que al parecer se use.

La generación de calor en los recién nacidos y en los animales en hibernación es un ejemplo especial del desacoplamiento deliberado de la traslocación de protones y síntesis de ATP. Este desacoplamiento fisiológico sucede en el tejido adiposo café, cuyo color se debe a su gran cantidad de mitocondrias. El tejido adiposo café se encuentra en abundancia en mamíferos recién nacidos, y en especies que hibernan. La energía libre del NADH no se conserva como ATP, sino que se pierde como calor, porque la oxidación se desacopla de la fosforilación. El desacoplamiento se debe a la termogenina, una proteína desacopladora que forma un canal para el reingreso de los protones al interior de la matriz mitocondrial. Cuando la termogenina está activa, la energía libre liberada se disipa en forma de calor y eleva la temperatura corporal del animal.

14.10 Transporte activo de ATP, ADP y P_i a través de la membrana mitocondrial

En las células eucarióticas, una gran fracción del ATP total sintetizada se hace en las mitocondrias. Se deben exportar esas moléculas, ya que la mayor parte de ellas se usan en el citoplasma. Debido a que la membrana mitocondrial interna es impermeable a las sustancias cargadas, se requiere un transportador que permita que entre ADP y que salga ATP de las mitocondrias. A este transportador se le llama adenina nucleótido translocasa. Intercambia ATP mitocondrial y ADP citosólico (figura 14.17). Normalmente, los nucleótidos de adenina son complejos con Mg^{2+}, pero eso no sucede cuando se transportan a través de la membrana. El intercambio de ADP^{3-} y ATP^{4-} causa la pérdida de una carga neta de -1 en la matriz. Este tipo de intercambio es en la parte eléctrica de la fuerza protonmotriz ($\Delta\Psi$). Algo de la energía libre del gradiente de concentración de protones se gasta en impulsar este proceso de transporte.

La formación de ATP a partir de ADP y P_i en la matriz mitocondrial también requiere un transportador de fosfato para importar P_i del citosol. El fosfato ($H_2PO_4^{-}$) es transportado hacia el interior de las mitocondrias en forma simpuesto electroneutral con $H^{\oplus}$ (figura 14.17). El transportador de fosfato no recurre al componente eléctrico de la fuerza protonmotriz, pero sí a la diferencia de concentración (pH). Así, los dos transportadores necesarios para la formación de ATP consumen algo de la fuerza protonmotriz generada por la traslocación de protones. El costo energético combinado para transportar ATP fuera de la matriz, y ADP y P_i hacia dentro de ella, equivale aproximadamente a la entrada de un protón. Por lo tanto, la síntesis de una molécula de ATP citoplásmico por la ATP sintasa requiere la entrada de cuatro protones desde el espacio entre membranas (uno para transporte y tres que pasan a través del componente F_0 de



◀Figura 14.17
Transporte de ATP, ADP y P_i a través de la membrana mitocondrial interna. La adenina nucleótido traslocasa lleva a cabo el intercambio unidireccional de ATP y ADP (antipuerto). El simpuerto de P_i y $H^{\oplus}$ es eléctricamente neutro.

la ATP sintasa). Las bacterias no necesitan transportar ATP o ADP a través de la membrana, por lo que el gasto total de la síntesis de ATP es menor que el de las células eucarióticas.

14.11 Relación P/O

Antes de haberse propuesto la teoría quimiosmótica, muchos investigadores buscaban un compuesto intermedio rico en energía y capaz de formar ATP por transferencia directa de grupo fosforilo. Suponían que cada uno de los complejos I, III y IV contribuían a la formación de ATP con estequiometría de uno por uno. Hoy se sabe que la transducción de energía sucede generando y consumiendo un gradiente de concentración de protones. El rendimiento de ATP no necesita ser equivalente para cada complejo de transporte de electrones con traslocación de protón, ni tampoco la producción de ATP por molécula oxidada de sustrato necesita ser un número entero.

Muchos complejos de transporte de electrones asociados a membrana contribuyen al mismo tiempo al gradiente de concentración de protones. Este depósito común de energía es usado por muchos complejos de ATP sintasa. En la sección anterior se vio que la formación de una molécula de ATP a partir de ADP y P_i, catalizada por ATP sintasa, requiere el paso de unos tres protones al interior, uno más del necesario para transportar al P_i, ADP y ATP a través de la membrana interna.

Los primeros bioquímicos que estudiaron estos procesos estaban interesados principalmente en la relación entre el consumo de oxígeno (respiración) y la síntesis de ATP (fosforilación). La relación P/O es la de moléculas fosforiladas a átomos de oxígeno reducidos. Se necesitan dos electrones para reducir un solo átomo de oxígeno ($1/2\ O_2$), por lo que interesa la cantidad de protones traslocados por cada par de electrones que pasan por los complejos I, III y IV. Se traslocan cuatro protones por el complejo I, cuatro por el complejo III y dos por el complejo IV. Así, por cada par de electrones que pasan por esos complejos, de NADH a O_2, un total de diez protones atraviesa la membrana.

Ya que cuatro protones se mueven de regreso a través de la membrana por cada molécula de ATP citoplásmico, la relación P/O es $10 \div 4 = 2.5$. La relación P/O para succinato sólo es $6 \div 4 = 1.5$, ya que los electrones aportados por la oxidación de succinato no pasan por el complejo I. Estos valores calculados se acercan a las relaciones P/O que se han observado en experimentos donde se mide la cantidad de O_2 reducido cuando se fosforila determinada cantidad de ADP (figura 14.3a).

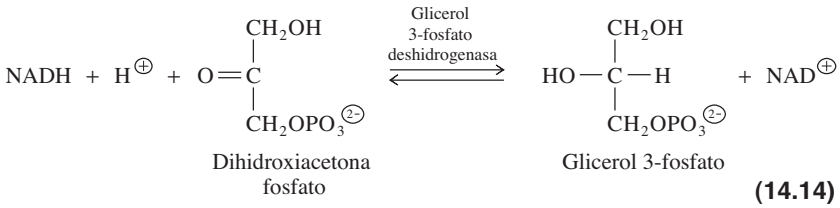
14.12 Mecanismos de lanzadera de NADH en eucariotas

El NADH se produce mediante diversas reacciones, en forma notable la catalizada por gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa durante la glucólisis, y tres reacciones del ciclo del ácido cítrico. El NADH se puede usar en forma directa en reacciones de biosíntesis como gluconeogénesis (donde la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa funciona en dirección contraria), síntesis de ácidos grasos, síntesis de aminoácidos y síntesis de nucleótidos.

El exceso de NADH se convierte en ATP por el proceso descrito en este capítulo. En las bacterias, la oxidación de NADH a partir de todas sus fuentes se logra con facilidad, ya que el sistema de transporte de electrones asociado a membrana está embebido en la membrana plasmática, y la superficie interna está expuesta al citosol. En las células eucarióticas, las únicas moléculas de NADH que tienen acceso directo al complejo I son las que hay en la matriz mitocondrial. Ese no es problema para los equivalentes reductores producidos en el ciclo del ácido cítrico, ya que esa ruta se localiza en las mitocondrias. Sin embargo, los equivalentes reductores producidos por glucólisis en el citosol deben entrar a las mitocondrias para activar la síntesis de ATP. Como ni el NADH ni el $NAD^{\oplus}$ pueden difundirse a través de la membrana mitocondrial interna,

los equivalentes reductores deben entrar a la mitocondria por mecanismos de lanzadera o vaivén. Las lanzaderas de glicerol fosfato y de malato-aspartato son rutas por las cuales una coenzima reducida en el citosol pasa su poder reductor a una molécula mitocondrial que entonces se transforma en un sustrato para la cadena de transporte de electrones.

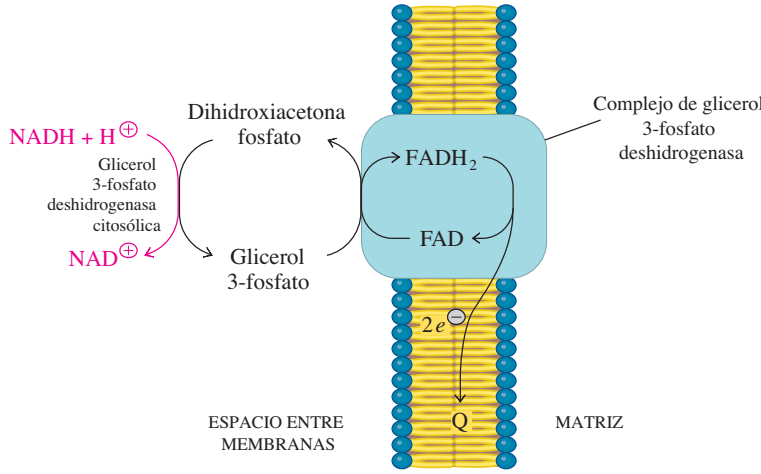
La lanzadera de glicerol fosfato (figura 14.18)(sección 13.4) es prominente en los músculos de vuelo en los insectos, que sostienen velocidades muy altas de síntesis de ATP. También está presente en menor grado en la mayor parte de las células de mamíferos. Se requieren dos glicerol 3-fosfato deshidrogenasas: una enzima citosólica dependiente de $NAD^{\oplus}$ y un complejo de deshidrogenasa embebido en la membrana, que contiene un grupo prostético FAD y tiene un sitio de unión con sustrato en la cara externa de la membrana mitocondrial interna. En el citosol, el NADH reduce la dihidroxiacetona fosfato en una reacción catalizada por glicerol 3-fosfato deshidrogenasa citosólica.



(14.14)

El glicerol 3-fosfato se regresa entonces a dihidroxiacetona fosfato por el complejo de deshidrogenasa embebido en la membrana. En el proceso se transfieren dos electrones al grupo prostético FAD de la enzima ligada a la membrana. El $FADH_2$ transfiere dos electrones al portador móvil de electrones Q, que entonces transfiere los electrones a la ubiquinol:citocromo *c* oxidorreductasa (complejo III). La oxidación de los equivalentes citosólicos de NADH por esta ruta produce menos energía (1.5 ATP por molécula de NADH citosólica) que la oxidación de NADH mitocondrial, porque los equivalentes reductores introducidos por la lanzadera se saltan a la NADH:ubiquinona oxidorreductasa (complejo I).

La lanzadera de malato-aspartato es más común. Esta lanzadera requiere versiones citosólicas de la malato deshidrogenasa. Es la misma enzima que se usa para convertir malato citosólico en oxaloacetato para la gluconeogénesis. La reacción inversa se requiere en la lanzadera de malato-aspartato. El funcionamiento de la lanzadera se ve en el diagrama de la figura 14.19. El NADH en el citosol reduce el oxaloacetato a malato



◀Figura 14.18
Lanzadera de glicerol fosfato. El NADH citosólico reduce la dihidroxiacetona fosfato a glicerol 3-fosfato en una reacción catalizada por glicerol 3-fosfato deshidrogenasa en el citosol. La reacción inversa es catalizada por una flavoproteína integral en la membrana, que transfiere electrones a la ubiquinona.

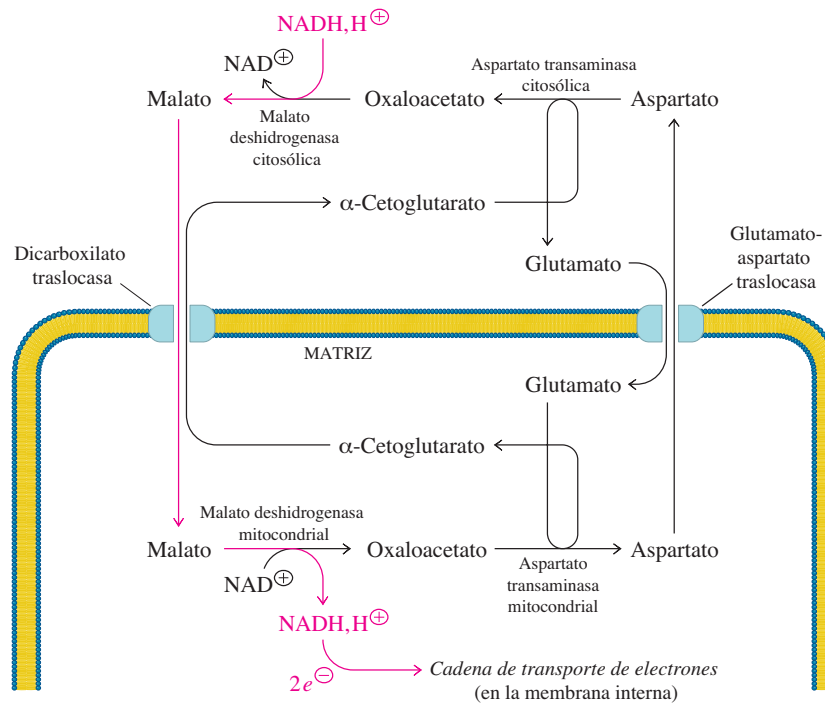


Figura 14.19 ▶
Lanzadera de malato-aspartato. El NADH en el citosol reduce el oxaloacetato a malato, que se transporta al interior de la matriz mitocondrial. La reoxidación del malato genera NADH que puede pasar electrones a la cadena de transporte de electrones. Para completar el ciclo de la lanzadera se necesitan las actividades de la aspartato transaminasa en el citosol y en las mitocondrias.

en la reacción catalizada por malato deshidrogenasa citosólica. El malato entra a la matriz mitocondrial a través de la dicarboxilato translocasa, en intercambio eléctricamente neutro por α-cetoglutarato. Dentro de las mitocondrias, la versión del ciclo de ácido cítrico, de la malato deshidrogenasa, cataliza la reoxidación de malato a oxaloacetato con reducción del $NAD^{\oplus}$ mitocondrial a NADH. A continuación el NADH se oxida por el complejo I de la cadena de transporte de electrones asociado a membrana.

La operación continua de la lanzadera requiere el regreso de oxaloacetato al citosol. El oxaloacetato no puede transportarse en forma directa a través de la membrana mitocondrial interna. En su lugar, el oxaloacetato reacciona con glutamato en forma reversible catalizada por aspartato transaminasa mitocondrial (sección 18.3). Esta reacción transfiere un grupo amino al oxaloacetato, produciendo aspartato y α-cetoglutarato. Cada molécula de α-cetoglutarato sale de la mitocondria a través de la dicarboxilato traslocasa a cambio de glutamato. Una vez en el citosol, el aspartato y el α-cetoglutarato son los sustratos de una forma citosólica de aspartato transaminasa que cataliza la formación de glutamato y oxaloacetato. El glutamato vuelve a entrar a la mitocondria en antipuerto con aspartato, y el oxaloacetato reacciona con otra molécula de NADH citosólico, repitiéndose el ciclo.

Este complicado sistema de lanzadera requiere varias enzimas que tienen versiones distintivas citoplásmicas y mitocondriales (como la malato deshidrogenasa). Por regla general, esas enzimas están codificadas por genes diferentes, pero relacionados, que descienden de un ancestro común por un evento antiguo de duplicación de gen. La compartimentalización de las rutas metabólicas en las células de eucariotas les proporciona algunas ventajas sobre las células bacterianas, pero requiere mecanismos para pasar los metabolitos a través de las membranas internas. Parte del costo de la compartimentalización es la duplicación de las enzimas que deben estar presentes en varios compartimientos. Esto explica en parte por qué los genomas eucarióticos contienen tantas familias de genes relacionados, en tanto que los genomas bacterianos suelen tener sólo una copia. Una de las propiedades notables de la secuencia del genoma humano es la presencia de muchas familias de genes de esta clase. Otro gran descubrimiento es la presencia de cientos de genes que intervienen en la traslocación de moléculas a través de las membranas. La dicarboxilato translocasa y la glutamato-aspartato translocasa que se describieron aquí (figura 14.19) son ejemplos de proteínas de transporte.

RECUADRO 14.2 El alto costo de vivir

El adulto activo promedio necesita unas 2 400 kilocalorías (10 080 kJ) por día. Si toda esta energía se tradujera en equivalentes de ATP, correspondería a la hidrólisis de 315 moles de ATP por día (suponiendo que la energía libre de Gibbs para la hidrólisis es 32 kJ mol^{-1}). Esto equivale aproximadamente a 155 kg de ATP (M_r = 507).

Todas estas moléculas de ATP se deben sintetizar, y con mucho, la ruta más común es la de síntesis de ATP impulsada por gradientes de protones en las mitocondrias. Los valores reales, calculados y medidos parecen indicar que la persona promedio fabrica 9×10^{20} moléculas de ATP por segundo, o 78×10^{24} moléculas por día. Son 130 moles, o 66 kg de ATP.

Así, un porcentaje importante de nuestra ingestión de calorías se convierte en un gradiente mitocondrial de protones para impulsar la síntesis del ATP. Estos cálculos también indican que las moléculas de ATP se renuevan con mucha rapidez, ya que es claro que no podemos cargar con unos 63 kg de ATP.

14.13 Otros aceptores y donadores terminales de electrones

Hasta ahora sólo se han considerado el NADH y el succinato como fuentes importantes de electrones en el transporte de electrones asociado a membrana. Estos compuestos reducidos se derivan principalmente de reacciones catabólicas de oxidación-reducción, como las que hay en la glucólisis y en el ciclo del ácido cítrico. El lector puede imaginar que la fuente última de glucosa es una ruta de biosíntesis dentro de un organismo fotosintético. Los electrones en los enlaces químicos de la glucosa fueron a dar allí usando energía luminosa. Así, la energía de la luz solar es la que impulsa la síntesis de ATP en las mitocondrias.

Esta es una imagen razonablemente exacta del flujo de energía en la moderna biósfera. Sin embargo, no explica cómo sobrevivió la vida antes de que hubiera fotosíntesis. La fotosíntesis no sólo suministró una fuente abundante de compuestos carbonados, sino que también es la responsable del aumento de las concentraciones de oxígeno en la atmósfera. Como se verá en el capítulo siguiente, la fotosíntesis también requiere un sistema de transporte de electrones asociado a membrana, acoplado a la síntesis de ATP. Es muy probable que el transporte respiratorio de electrones, como se describió en este capítulo, evolucionara primero y el mecanismo de la fotosíntesis viniera después. Tal vez haya habido vida en este planeta durante millones de años antes de que la fotosíntesis se volviera común.

¿Cuál era la fuente última de energía antes de la luz solar? Se tiene una idea bastante buena de cómo funcionaba el metabolismo al principio, porque todavía hay bacterias quimioautótrofas vivientes en la actualidad. Estas especies no necesitan moléculas orgánicas como fuente de carbono o de energía, y no capturan energía de la luz solar.

Los organismos quimioautótrofos obtienen su energía oxidando compuestos inorgánicos como H_2, $NH_4^{\oplus}$, $NO_2^{\ominus}$, H_2S, S o $Fe^{(2+)}$. Estas moléculas inorgánicas sirven como fuente directa de electrones energéticos en transporte de electrones asociado a membrana. Los aceptores terminales de electrones pueden ser O_2, fumarato o una gran variedad de otras moléculas. Cuando los electrones pasan por su cadena de transporte de electrones, se genera una fuerza protonmotriz y se sintetiza ATP. En la figura 14.20, de la página siguiente, se muestra un ejemplo de esas rutas.

En ese ejemplo, el donador de electrones es el hidrógeno. Una hidrogenasa unida a la membrana oxida al hidrógeno y forma protones. Tales hidrogenasas son comunes en una gran variedad de especies bacterianas. Los electrones pasan por complejos de citocromo parecidos a los del transporte de electrones respiratorio. En la mayor parte de las bacterias, la quinona móvil no es ubiquinona, sino una molécula relacionada llamada menaquinona (figura 14.21, página siguiente). La fumarato reductasa cataliza la reducción de fumarato a succinato, usando menaquinona reducida (MQH_2) como donador de electrones.

E. coli puede usar fumarato en vez de oxígeno como receptor terminal de electrones cuando se cultiva bajo condiciones anaeróbicas. La fumarato reductasa es una enzima de múltiples subunidades embebidas en la membrana plasmática. Es homóloga a la succinato deshidrogenasa, y las dos enzimas catalizan una reacción muy parecida, pero en direcciones distintas. En *E. coli*, esas dos enzimas no se expresan al mismo tiempo; *in vivo* cada una cataliza su reacción sólo en una dirección (la relacionada con el nombre de la enzima). Este es uno de los pocos casos en que los genomas bacterianos contienen una

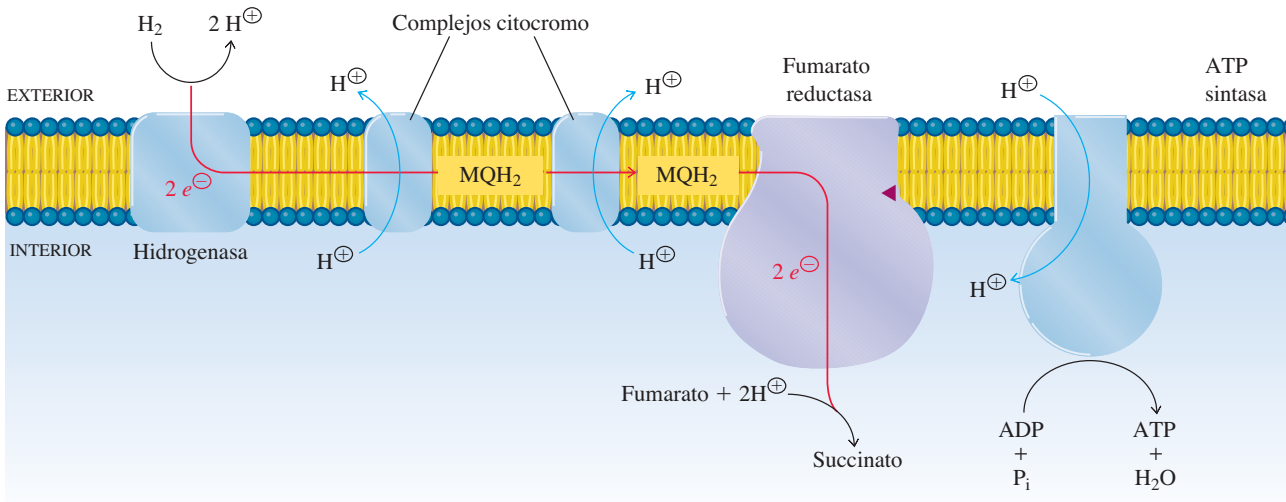
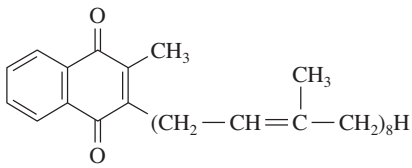


Figura 14.20
Una ruta posible de síntesis de ATP en bacterias quimioautótrofas. El hidrógeno se oxida por una hidrogenasa unida a la membrana, y los electrones atraviesan diversos complejos de citocromo en la membrana. La transferencia de electrones se acopla a la traslocación de protones a través de la membrana, y la fuerza protón motriz que resulta se usa para impulsar la síntesis de ATP. El receptor terminal de electrones es el fumarato. La fumarato reductasa reduce el fumarato a succinato.



Menaquinona

Figura 14.21 ▲
Menaquinona (se abrevia MQ).

familia de genes relacionados. Cada gen codifica una versión ligeramente distinta de la misma enzima.

Además del oxígeno y el fumarato, el nitrato y el sulfato también pueden ser aceptores de electrones. Hay muchas combinaciones diferentes de donadores y aceptores de electrones, y complejos de transporte de electrones en las bacterias quimioautótrofas. Lo importante es que esas bacterias extraen energía de compuestos inorgánicos en ausencia de luz, y pueden sobrevivir sin oxígeno. Las bacterias quimioautótrofas representan estrategias metabólicas que pudieron existir en organismos antiguos.

14.14 Aniones superóxido

Una de las desafortunadas consecuencias del metabolismo del oxígeno es la producción de especies reactivas de oxígeno, como el radical superóxido ($\cdot O_2^{\ominus}$), radical hidroxilo ($OH\cdot$), y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Todas estas especies son muy tóxicas para las células. Las producen las flavoproteínas, quinonas y proteínas de hierro-azufre. Casi todas las reacciones de transporte de electrones producen pequeñas cantidades de estas especies activas, en especial $\cdot O_2^{\ominus}$. Si el radical supéroxido no se elimina rápidamente por la superóxido dismutasa, causará la descomposición de proteínas y ácidos nucleicos.

Ya se describió la superóxido dismutasa como ejemplo de una enzima con un mecanismo controlado por difusión (sección 6.4B). La reacción total que cataliza esta enzima es la dismutación de dos aniones superóxido para formar peróxido de hidrógeno. Esta reacción se efectúa con extrema rapidez.

$$2\ \cdot O_2^{\ominus} + 2\ H^{\oplus} \longrightarrow H_2O_2 + O_2 \qquad \textbf{(14.15)}$$

La rapidez de este proceso es típica de los mecanismos de transferencia de electrones. En este caso, un ion cobre es el único agente de transferencia de electrones unido a la enzima. Elion de cobre se reduce por el anión superóxido ($\cdot O_2^{\ominus}$), y a continuación reduce a otra molécula de $\cdot O_2^{\ominus}$. El peróxido de hidrógeno formado se puede convertir en H_2O y O_2 por acción de la catalasa.

$$2\ H_2O_2 \longrightarrow 2\ H_2O + O_2 \qquad \textbf{(14.16)}$$

Algunas especies bacterianas son anaeróbicas obligatorias. Mueren en presencia de oxígeno, porque no pueden agotar las especies reactivas de oxígeno que se producen como subproducto de reacciones de óxido-reducción. Esas especies no tienen superóxido dismutasa. Todas las especies aeróbicas tienen enzimas que secuestran las moléculas de oxígeno reactivo.

Resumen

1. La energía en las coenzimas reducidas se recupera como ATP mediante el sistema de transporte de electrones asociado a membrana, acoplado a la síntesis de ATP.

2. Las mitocondrias están rodeadas por una membrana doble. Los complejos de transporte de electrones y la ATP sintasa están embebidas en la membrana interna. Esta membrana interna está muy plegada.

3. La teoría quimiosmótica explica la forma en que se puede usar un gradiente de protones para sintetizar ATP. La energía libre asociada a la fuerza protonmotriz se debe casi por completo a la diferencia de cargas a través de la membrana.

4. Los complejos de transporte de electrones del I al IV contienen múltiples polipéptidos y cofactores. Los portadores de electrones están arreglados aproximadamente por potencial de reducción creciente. Los portadores móviles ubiquinona (Q) y citocromo *c* vinculan las reacciones de óxido-reducción de los complejos.

5. La transferencia de un par de electrones de NADH a Q por el complejo I aporta cuatro protones al gradiente de concentración de protones.

6. El complejo II no participa directamente en el gradiente de concentración de protones, sino más bien suministra electrones de oxidación del succinato a la cadena de transporte de electrones.

7. La transferencia de un par de electrones de QH_2 a el citocromo *c* por el complejo III se acopla al transporte de cuatro protones mediante el ciclo Q.

8. La transferencia de un par de electrones del citocromo *c* y la reducción de $\frac{1}{2}O_2$ a H_2O por el complejo IV aporta dos protones al gradiente.

9. Los protones regresan a través de la membrana mediante el complejo V (ATP sintasa). El flujo de protones impulsa la síntesis de ATP, a partir de ADP + P_i, mediante cambios de conformación producidos por el funcionamiento de un motor molecular.

10. El transporte de ADP y P_i al interior, y de ATP al exterior de la matriz mitocondrial, consume el equivalente de un protón.

11. La relación de P/O, la producción de ATP por cada par de electrones transferidos por los complejos I a IV, depende de la cantidad de protones traslocados. La oxidación del NADH mitocondrial genera 2.5 ATP; la oxidación de succinato genera 1.5 ATP.

12. El NADH citosólico puede contribuir a la fosforilación oxidativa cuando el poder reductor se transfiere a las mitocondrias por acción de lanzaderas.

13. La superóxido dismutasa convierte los radicales superóxido a peróxido de hidrógeno. La catalasa elimina al peróxido de hidrógeno.

Problemas

1. Los átomos de hierro de seis citocromos diferentes en la cadena de transporte de electrones respiratoria participan en reacciones de transferencia de un electrón, y van y vienen entre los estados Fe(II) y Fe(III). Explique por qué los potenciales de reducción de los citocromos no son idénticos, sino que van de −0.10 V a 0.39 V.

2. Los sistemas funcionales de transporte de electrones se pueden reconstituir a partir de componentes purificados de la cadena de transporte de electrones respiratoria y de partículas de membrana. Para cada uno de los siguientes conjuntos de componentes, determine cuál es el receptor final de electrones. Suponga que está presente O_2.
   a) NADH, Q, complejos I, III y IV
   b) NADH, Q, citocromo *c*, complejos II y III
   c) succinato, Q, citocromo *c*, complejos II, III y IV
   d) succinato, Q, citocromo *c*, complejos II y III

3. Se ha identificado en el humano un gen que al parecer participa en la eficiencia con la que se utilizan las calorías, y se han propuesto medicamentos contra la obesidad para regular la cantidad de proteína desacopladora-2 (UCP-2, uncoupling protein-2) producida por el gen. La proteína UCP-2 está presente en muchos tejidos humanos y se ha demostrado que es un traslocador de protones en las membranas mitocondriales. Explique cómo al aumentar la presencia de la proteína UCP-2 podría causarse pérdida de peso en los humanos.

4. *a*) Cuando se agrega Demerol (meperidine, analgésico que se receta con mucha frecuencia), a una suspensión de mitocondrias en respiración, aumentan las relaciones de NADH/$NAD^{\oplus}$ y Q/QH_2. ¿Cuál complejo de transporte de electrones es inhibido por el Demerol?
   b) Cuando el antibiótico mixotiazol se añade a mitocondrias en respiración, aumentan las relaciones de citocromo c_1 (Fe^{3+})/citocromo c_1 (Fe^{2+}) y citocromo b_{566} (Fe^{3+})/citocromo b_L(Fe^{2+}). ¿Dónde inhibe el mixotiazol la cadena de transporte de electrones?

5. *a*) La toxicidad del cianuro ($CN^{\ominus}$) se debe a su unión a los átomos de hierro del complejo citocromo *a*,a_3 y la consecuente inhibición del transporte de electrones

mitocondrial. ¿Cómo evita este complejo de cianuro-hierro que el oxígeno acepte electrones de la cadena de transporte de electrones?

b) A los pacientes que se han expuesto al cianuro se les pueden administrar nitritos que convierten el hierro Fe^{2+} de la oxihemoglobina a Fe^{3+} (metahemoglobina). Dada la afinidad del cianuro hacia el Fe^{3+}, sugiera cómo podría funcionar este tratamiento con nitrito para disminuir los efectos del cianuro sobre la cadena de transporte de electrones.

6. La acetil-CoA deshidrogenasa cataliza la oxidación de ácidos grasos. Los electrones de las reacciones de oxidación se transfieren a FAD y entran a la cadena de transporte de electrones a través de Q. El potencial de reducción del ácido graso en la reacción catalizada por deshidrogenasa es alrededor de −0.05 V. Calcule los cambios de energía libre para demostrar por qué el FAD, y no el NAD^+, es el agente oxidante preferido.

7. Para cada uno de los donadores de dos electrones que siguen, indique la cantidad de protones traslocados de la mitocondria, la cantidad de moléculas de ATP sintetizadas y la relación P/O. Suponga que al final los electrones pasan al O_2, que se genera NADH en la mitocondria y que los sistemas de transporte de electrones y de fosforilación oxidativa funcionan totalmente.

a) NADH

b) succinato

c) ascorbato/tetrametil-*p*-fenilenediamina (dona dos electrones al citocromo *c*)

8. *a*) ¿Por qué el transporte de ATP hacia el exterior es favorecido frente al transporte de ADP hacia el exterior por el transportador de adenina nucleótido?

b) ¿La traslocación de ATP tiene costo energético para la célula?

9. La atractilosida es un glucósido tóxico procedente de un cardo del Mediterráneo que inhibe en forma específica al transportador de ADP/ATP. ¿Por qué la atractilosida también hace que se inhiba el transporte de electrones?

10. *a*) Calcule la fuerza protonmotriz a través de la membrana mitocondrial interna a 25°C, cuando la diferencia eléctrica es −0.18 V (el interior negativo), el pH externo es 6.7 y el pH interno es 7.5.

b) ¿Qué porcentaje de la energía se debe al gradiente químico (pH) y qué porcentaje se debe al gradiente de carga?

11. *a*) ¿Por qué el NADH generado en el citosol y transportado a la mitocondria por la lanzadera de malato-aspartato produce menos moléculas de ATP que el NADH generado en la mitocondria?

b) Calcule la cantidad de equivalentes de ATP producidos por la oxidación completa de una molécula de glucosa para formar seis moléculas de CO_2 en el hígado, cuando está funcionando la lanzadera de malato-aspartato. Suponga que las condiciones son aeróbicas y que los sistemas de transporte de electrones y de fosforilación oxidativa son totalmente funcionales.

Lecturas seleccionadas

Teoría quimiosmótica

Mitchell, P. (1979). Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science* 206:1148-1159. Presentación de Mitchell en los Premios Nobel, donde se relacionan los conceptos y la controversial historia de la teoría quimiosmótica.

Rich, P. (2003). The cost of Living. *Nature* 421: 583.

Schultz, B. y Chan, S. I. (2001). Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30:23-65. Una reseña de los mecanismos de traslocación de protones de cada uno de los complejos de transporte de electrones.

Complejos de transporte de electrones

Berry, E. A., Guergova-Kuras, M., Huang, L. y Crofts, A. R. (2000). Structure and function of cytochrome *bc* complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 60:1005-1075.

Cecchini, G. (2003). Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annu. Rev. Biochem.* 72:77-100.

Crofts, A. R. (2004). The cytochrome bc_1 complex: function in the context of structure. *Annu. Rev. Physiol.* 66:689-733.

Guénebaut, V., Schlitt, A., Weiss, H., Leonard, K. y Friedrich, T. (1998). Consistent structure between bacterial and mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J. Mol. Biol.* 276:105-112.

Grigorief, N. (1999). Structure of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Curr. Opin. Sruct. Biol.* 9:476-483.

Hunte, C., Palsdottir, H. y Trumpower, B. L. (2003). Protonmotive pathways and mechanisms in the cytochrome bc_1 complex. *FEBS Lett.* 545:39-46.

Richter, O. M. y Ludwig, B. (2003). Cytochrome *c* oxidase-structure, function and physiology of a redox-driven molecular machine. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 147:47-74.

ATP sintasa

Capaldi, R. A. y Aggler, R. (2002). Mechanisms of the F_1F_0-type ATP synthase, a biological rotary motor. *Trends Biochem. Sci.* 27:154-160.

Nishio, K., Iwamoto-Kihara, A., Yamamoto, A., Wada, Y. y Futai, M. (2002). Subunit rotation of ATP synthase: *a* or β subunit rotation relative to the *c* subunit ring. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 99:13448-13452.

Noji, H. (1998). The rotary enzyme of the cell: the rotation of F_1-ATPase. *Science* 287:1844-1845. Ensayo que describe la rotación de la F_1 ATPasa.

Oster, G. y Wang, H. (2003). Rotary protein motors. *Trends Cell Biol.* 13:114-121.

Otros donadores y aceptores de electrones

Hederstedt, L. (1999). Respiration without O_2. *Science* 284:1941-1942. Describe la evolución de la fumarato reductasa y la succinato deshidrogenasa.

Iverson, T. M., Luna-Chavez, C., Cecchini, G. y Rees, D. C. (1999). Structure of the *Escherichia coli* fumarate reductase respiratory complex. *Science* 284:1961-1966.

Peters, J. W., Lanzilotta, W. N., Lemon, B. J. y Seefeldt, L. C. (1998). X-ray crystal structure of the Fe-only dehydrogenase (CpI) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution. Science 282:1853-1858.

Tielens, A. G. M., Rotte, C., van Hellemond, J. J. y Martin, W. (2002). Mitochondria as we don't know them. *Trends Biochem. Sci.* 27:564-572. Reseña corta de algunas mitocondrias excepcionales que producen ATP en ausencia de oxígeno.

Yankovskaya, V., Horsefield, R., Törnroth, S., Luna-Chavez, C., Miyoshi H., Léger, C., Byrne, B. y Iwata, S. (2003). Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science* 299:700-704. Describe la estructura de la succinato deshidrogenasa y compara la actividad de esta enzima con la de la fumarato reductasa relacionada.

15

Capítulo quince

Fotosíntesis

El aspecto más importante de la fotosíntesis es la conversión de la energía luminosa en energía química en forma de ATP. El principio básico de este proceso fundamental es parecido al del transporte de electrones asociado a membrana, expuesto en el capítulo anterior. En la fotosíntesis, la luz cae sobre una molécula de pigmento (como la clorofila) y un electrón se excita y sube a un nivel de mayor energía. Cuando regresa el electrón a su estado final, cede energía, y esa energía se usa para traslocar protones que atraviesan una membrana. Con ello se crea un gradiente de protones que sirve para impulsar la fosforilación de ADP en una reacción catalizada por la ATP sintasa. En algunos casos se sintetizan equivalentes reductores en forma de NADPH de manera directa, cuando se usa el electrón excitado para reducir al $NADP^{\oplus}$. Esas reacciones se llaman **reacciones luminosas** porque dependen por completo de la luz solar.

Con frecuencia, las especies fotosintéticas usan su abundante reserva de ATP (y NADPH) para sintetizar carbohidratos a partir de CO_2. Hablando con propiedad, la fijación de CO_2 no requiere luz, y no se acopla a las reacciones luminosas en forma directa. Por esta razón, esas reacciones se llaman **reacciones oscuras.** La principal ruta de fijación de CO_2 se llama ciclo de Calvin. Se relaciona mucho con la ruta de la pentosa fosfato que se describió en la sección 12.4.

Los detalles de las reacciones fotosintéticas tienen extremada importancia para comprender la bioquímica de toda vida en el planeta. La capacidad de aprovechar la energía luminosa para sintetizar macromoléculas condujo a una expansión rápida de los organismos fotosintéticos. Eso, a su vez, creó oportunidades para especies que pudieran aprovechar en forma derivada a los organismos fotosintéticos como fuentes de alimento. Los animales, como los humanos, obtienen en último término mucha de su energía degradando moléculas que en forma original fueron sintetizadas con la energía de la luz solar. Además, el oxígeno es un subproducto de la fotosíntesis de las plantas y de algunas bacterias. La acumulación de oxígeno en la atmósfera terrestre originó su papel como

Arriba: Luz solar en *trillium* (planta de Norteamérica) en los bosques. La energía solar capturada por los organismos fotosintéticos sostiene, en último término, las actividades de casi todos los organismos en la Tierra.

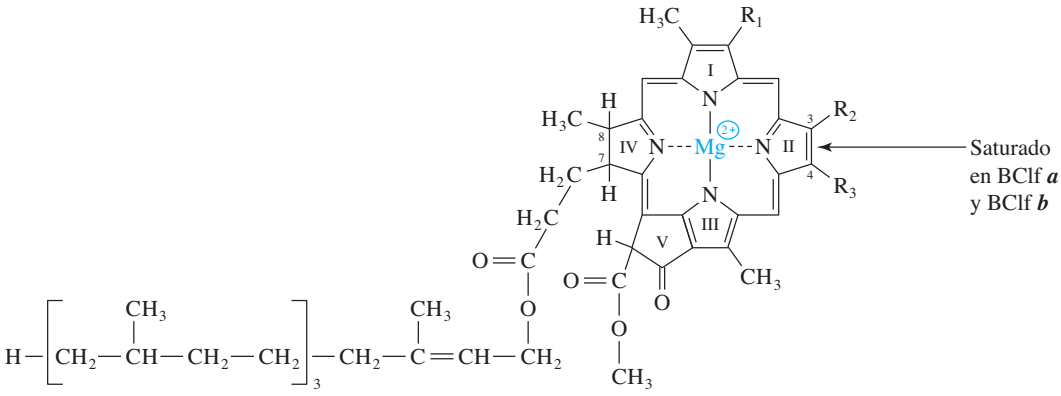
receptor de electrones en el transporte de electrones asociado a membrana. Con pocas excepciones, los eucariotas modernos dependen hoy en forma absoluta de la reserva de oxígeno producido por la fotosíntesis para sintetizar ATP en sus mitocondrias.

Los componentes principales de las reacciones luminosas son grandes complejos de proteínas, pigmentos y cofactores embebidos en una membrana. La parte de aprovechamiento de la luz en esos complejos se llama **fotosistema.** Las distintas especies usan una variedad de estrategias diferentes para usar la energía luminosa para sintetizar ATP, NADPH, o ambas. Primero se describirán la estructura y funciones de los fotosistemas en bacterias, y a continuación la ruta de la fotosíntesis, más compleja, en los eucariotas como las algas y las plantas. Los complejos fotosintéticos de los eucariotas evolucionaron claramente de los bacterianos.

▲Organismos fotosintéticos. Izquierda: bacterias púrpura; centro: hojas de una planta de flor; derecha: cianobacterias.

15.1 Pigmentos recolectores de luz

Las clorofilas (Clf) son los pigmentos más importantes en la fotosíntesis. En la figura 15.1 se ven las estructuras de las moléculas más comunes de clorofila. Nótese que el anillo de tetrapirrol en las clorofilas se parece al del hemo (figura 7.33), pero en la clorofila el anillo está reducido. Tiene un doble enlace menos en el sistema del anillo conjugado, entre la posición 7 y 8 del anillo IV. Las clorofilas contienen un ion central



Especies de Clf	R_1	R_2	R_3
Clf *a*	$-CH=CH_2$	$-CH_3$	$-CH_2-CH_3$
Clf *b*	$-CH=CH_2$	$-C(=O)-H$	$-CH_2-CH_3$
BClf *a*	$-C(=O)-CH_3$	$-CH_3$	$-CH_2-CH_3$
BClf *b*	$-C(=O)-CH_3$	$-CH_3$	$-CH=CH_2$

Figura 15.1 ▲
Estructuras de los pigmentos de clorofila (Clf) y bacterioclorofila (BClf). En la tabla se indican como R_1, R_2 y R_3 las diferencias en los grupos sustituyentes. En las bacterioclorofilas, el doble enlace indicado en el anillo II está saturado. En algunas moléculas de bacterioclorofila *a*, la cadena lateral del fitol tiene tres dobles enlaces adicionales. La cadena lateral hidrofóbica del fitol, y el anillo hidrofílico de la porfirina, dan características anfipáticas a la clorofila. La clorofila (unida a proteínas) se encuentra en los fotosistemas y en los complejos asociados de aprovechamiento de la luz.

quelado de Mg^{2+} en vez del Fe^{2+} que tiene el grupo hemo. Otra propiedad distintiva de las clorofilas es que poseen una larga cadena lateral de fitol, que contribuye a su hidrofobicidad.

Hay muchos y diversos tipos de clorofila. En su mayor parte difieren en las cadenas laterales identificadas con R_1, R_2 y R_3 en la figura 15.1. La clorofila *a* (Clf *a*) y la clorofila *b* (Clf *b*) se encuentran en una gran cantidad de especies. La bacterioclorofila *a* (BClf *a*) y la bacterioclorofila *b* (BClf *b*) sólo se encuentran en las bacterias fotosintéticas. Su diferencia respecto de las otras clorofilas es que tienen un doble enlace menos en el anillo II. La feofitina (Ph) y la bacteriofeofitina (BPh) son pigmentos parecidos, donde el Mg^{2+} en la cavidad central está sustituido por dos hidrógenos enlazados en forma covalente.

Las moléculas de clorofila se obtienen en forma específica en la membrana por enlazamiento no covalente a las proteínas integrales de membrana. La cadena lateral hidrofóbica del fitol ayuda a anclar a la clorofila en la membrana. La función de absorción de luz en la clorofila se debe al anillo de tetrapirrol con su red de dobles enlaces conjugados. Las clorofilas absorben luz en la región de violeta a azul (máxima absorción de 400 a 500 nm) y en la región de naranja a rojo (máxima absorción de 650 a 700 nm) del espectro electromagnético (figura 15.2). Es por eso que las clorofilas son verdes, pues es la parte del espectro que reflejan, que no absorben. Los máximos de absorción exactos de las clorofilas dependen de sus estructuras; por ejemplo, la clorofila *a* difiere de la clorofila *b*. Los máximos de absorción de determinadas moléculas de clorofila también están influidos por su microambiente dentro del complejo pigmento-proteína.

Un solo cuantum de energía es un **fotón.** Cuando una molécula de clorofila absorbe un fotón, un electrón del nivel más bajo de energía en el pigmento sube a un orbital molecular de mayor energía. La energía del fotón absorbido debe ser igual a la diferencia de energía entre el estado fundamental y los orbitales de mayor energía; por ello, la clorofila sólo absorbe ciertas longitudes de onda de la luz. El electrón excitado, de alta energía, puede ser transferido a centros cercanos de oxido-reducción de la misma manera en que los electrones de alta energía se pueden transferir de NADH a FMN en el complejo I durante el transporte respiratorio de electrones (sección 14.5). La diferencia principal entre la fotosíntesis y el transporte de electrones respiratorio es la fuente de los electrones excitados. En el transporte respiratorio, los electrones provienen de reacciones químicas de oxido-reducción que producen NADH y QH_2. En la fotosíntesis, los electrones suben en forma directa a un estado de alta energía absorbiendo un fotón de luz.

Las moléculas de clorofila pueden tener tres estados diferentes. En el estado fundamental (Clf o Clf^0), todos los electrones están en su nivel normal y estable. En el estado excitado (Clf^*) se ha absorbido un fotón de luz. Después de la transferencia del electrón, la molécula de clorofila está en el estado oxidado $(Clf^{\oplus})$ y se debe regenerar recibiendo un electrón procedente de un agente reductor.

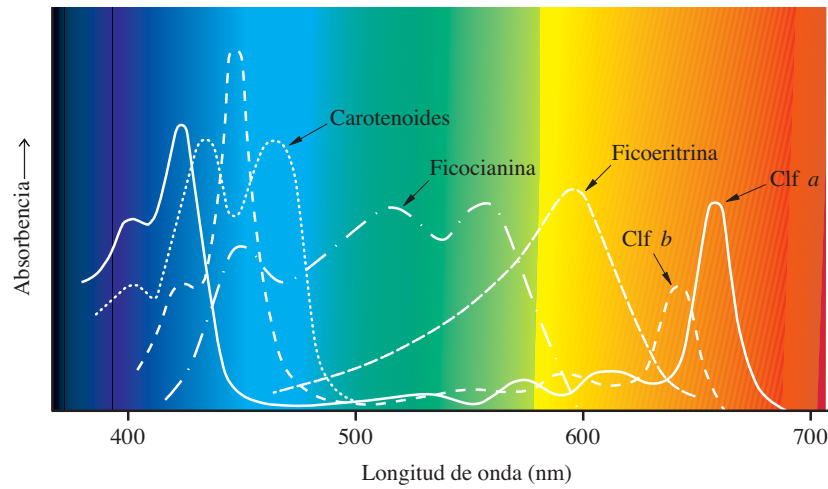


Figura 15.2 ▶
Espectros de absorción de los principales pigmentos fotosintéticos. En conjunto, los pigmentos absorben energía radiante de todo el espectro de la luz visible. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

La energía de un fotón de luz se calcula con la ecuación

$$E = \frac{hc}{\lambda} \qquad \textbf{(15.1)}$$

donde h es la constante de Planck $(6.63 \times 10^{-34}\ \text{J s})$, c es la velocidad de la luz $(3.00 \times 10^{8}\ \text{m s}^{-1})$, y λ es la longitud de onda de la luz. Con frecuencia conviene calcular la energía total de un "mol" de fotones multiplicando E por 6.022×10^{23} (el número de Avogadro). Así, para la luz de una longitud de onda de 680 nm, la energía es 76 kJ mol^{-1}. Se parece a la de un cambio de energía libre de Gibbs. Quiere decir que cuando un mol de moléculas de clorofila absorbe un mol de fotones, los electrones excitados adquieren una cantidad de energía igual a 182 kJ mol^{-1}. Al regresar a su estado fundamental, ceden esta energía. Algo de la energía capturada se usa para bombear protones a través de la membrana para sintetizar NADPH.

Un fotosistema típico contiene docenas de moléculas de clorofila, pero en realidad sólo dos moléculas especiales de clorofila ceden electrones para iniciar la cadena de transporte de electrones. A esas dos moléculas de clorofila se les llama **par especial.** En la mayor parte de los casos, el par especial se identifica sólo como pigmentos (P) que absorben luz a una longitud de onda específica. Así, el P680 es el par especial de moléculas de clorofila que absorbe luz a 680 nm (roja). Sus tres estados son P680, P680* y $\text{P680}^{\oplus}$. El P680 es el estado fundamental. El P680* es el estado después de absorber un fotón de luz, cuando las moléculas de clorofila tienen un electrón excitado. El $\text{P680}^{\oplus}$ es el estado deficiente en electrones (oxidado) después de la transferencia de un electrón a otra molécula. El $\text{P680}^{\oplus}$ se reduce a P680 por transferencia de un electrón procedente de un donador de electrones.

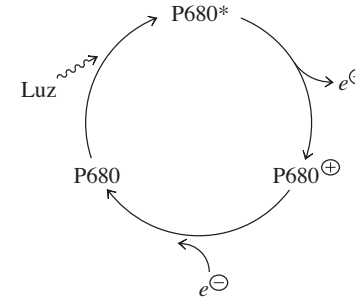
Además del par especial hay otras moléculas especializadas de clorofila que funcionan como parte de la cadena de transferencia de electrones. Aceptan electrones del par especial y los transfieren a la siguiente molécula en la ruta. Las clorofilas restantes actúan como moléculas antena, capturando energía luminosa y transfiriéndola al par especial. Esas clorofilas antena son mucho más numerosas que las moléculas de la cadena de transferencia de electrones. El modo de transferencia de energía de excitación entre las clorofilas antena se llama transferencia de energía por resonancia. No implica el movimiento de electrones. Se puede imaginar que la transferencia de energía de excitación es de energía de vibración entre moléculas adyacentes de clorofila, en el complejo antena, que está densamente empacado.

La figura 15.3 de la página siguiente ilustra la transferencia de energía de excitación desde las clorofilas antena hasta el par especial en uno de los fotosistemas que se examinarán en la próxima sección. Todas las moléculas de clorofila están sujetas en posiciones fijas por interacciones con cadenas laterales de aminoácidos en los polipéptidos del fotosistema. Como esas moléculas están tan cercanas entre sí, la energía de excitación se transfiere en forma eficiente desde cualquier molécula que absorba un fotón.

Las membranas fotosintéticas contienen varios **pigmentos accesorios,** además de la clorofila. Entre los carotenoides están el β-caroteno (figura 15.4, página 449) y los relacionados, como son las xantofilas. Las xantofilas tienen grupos hidroxilo adicionales en los dos anillos. Nótese que los carotenoides, como la clorofila, contienen una serie de dobles enlaces conjugados que les permiten absorber la luz. Sus máximos de absorción están en la región azul del espectro, y es la causa de que se vean rojos, amarillos o cafés (figura 15.2). Los colores otoñales de los árboles decíduos se deben a los carotenoides, así como el color café del *kelp* o varec marino (algas cafés).

Los carotenoides tienen una relación estrecha con las moléculas de clorofila en los complejos antena. Absorben luz y transfiere energía de excitación a clorofilas adyacentes. Además de funcionar como pigmentos recolectores de luz, los carotenoides también tienen un papel protector en la fotosíntesis. Toman todos los electrones que se liberan en forma accidental en las clorofilas antena, y los regresan a la molécula de clorofila oxidada. Este proceso de amortiguamiento evita la formación de especies reactivas de oxígeno, como el radical superóxido $(\cdot O_2^{\ominus})$. Si se les dejara formarse, esas especies reactivas de oxígeno pueden ser muy tóxicas para las células, como se indicó en la sección 14.14.

El cambio de energía libre de Gibbs asociado a la fuerza protón motriz se calcula en la sección 14.3B.



▲ Reducción, excitación y oxidación del P680. El estado excitado después de absorber un fotón de luz es P680*. La pérdida de un electrón produce el estado oxidado del $\text{P680}^{\oplus}$. La ganancia de un electrón procedente de fuente externa (como la oxidación de agua) da como resultado el estado reducido del P680.

▲ Octubre en el noroeste de Vermont. Los colores otoñales de las hojas se deben, en parte, a la presencia de los pigmentos accesorios que se vuelven visibles cuando se degradan las moléculas de clorofila al morir las hojas. Algunos de los colores más brillantes se deben a las antocianinas. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

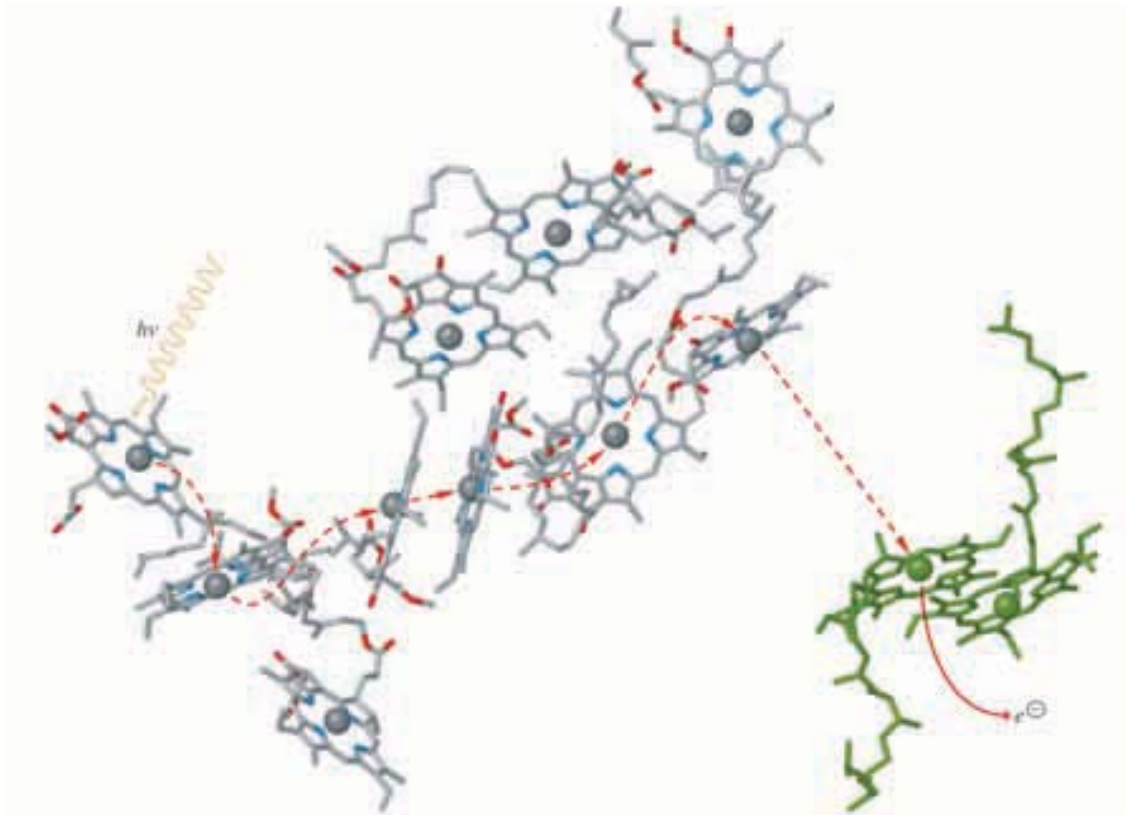
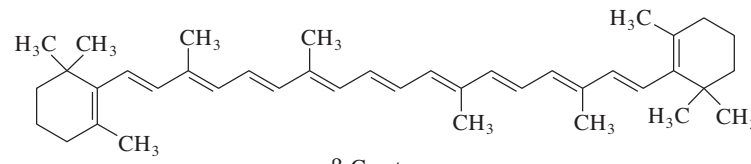
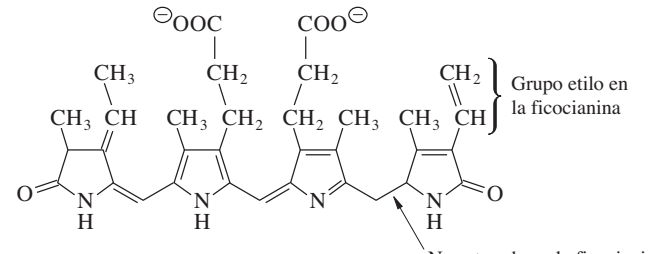


Figura 15.3 ▲
Transferencia de energía luminosa desde pigmentos antena de la clorofila al par especial de moléculas de clorofila. Los pigmentos antena (en gris) pueden capturar la luz, y la energía de excitación se transfiere entre las clorofilas antena hasta que llega al par especial de moléculas de clorofila en la ruta de transferencia de electrones (en verde). La ruta de transferencia de energía de excitación se marca en rojo. El par especial cede un electrón a la ruta de transferencia de electrones. Las moléculas de clorofila se mantienen en posiciones fijas, porque están estrechamente unidas a proteínas de membrana (que no se muestran). (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

Figura 15.4 ▶
Estructuras de algunos pigmentos accesorios. El *β*-caroteno es un carotenoide, y la ficoeritrina y ficocianina son ficobilinas. Las ficobilinas están enlazadas en forma covalente a proteínas, en tanto que los carotenoides están enlazados en forma no covalente.



β-Caroteno



Ficoeritrina

Las ficobilinas, como la ficoeritrina y la ficocianina (figura 15.4) se encuentran en algunas algas y cianobacterias. Como las clorofilas y los carotenoides, esas moléculas contienen una serie de dobles enlaces conjugados que les permiten absorber luz. Igual

que en los carotenoides, los máximos de absorción en las ficobilinas complementan a los de las clorofilas, y con ello amplían el intervalo de energía luminosa que puede ser absorbida. En la mayor parte de los casos, las ficobilinas se encuentran en complejos antena especiales llamados ficobilisomas. A diferencia de otras moléculas de pigmento, las ficobilinas están unidas en forma covalente a sus polipéptidos. El color azulado de las cianobacterias azul verdosas, y el rojo de las algas verdes, se deben a la presencia de numerosos ficobilisomas asociados a sus fotosistemas.

15.2 Fotosistemas bacterianos

La descripción de la fotosíntesis se comenzará presentando sistemas bacterianos simples. Estos sistemas sencillos evolucionaron hacia estructuras más complicadas en las cianobacterias. La versión de la fotosíntesis en las cianobacterias fue adoptada entonces por las algas y las plantas, desde que una cianobacteria primitiva originó los cloroplastos.

Las bacterias fotosintéticas contienen fotosistemas típicos de recolección de luz. Hay dos tipos básicos de fotosistemas que parecen haberse apartado de un ancestro común, hace más de dos mil millones de años. Ambos tipos de fotosistemas contienen una gran cantidad de pigmentos antena que rodean un pequeño centro de reacción ubicado en la parte media de la estructura. El centro de reacción consiste en unas pocas moléculas de clorofila, que incluyen al par especial y a otras que forman una cadena corta de transferencia de electrones.

El **fotosistema I** (PSI) contiene un **centro de reacción tipo I** (RCI). El **fotosistema II** (PSII) contiene un **centro de reacción tipo II** (RCII). Las heliobacterias y las bacterias sulfurosas verdes se basan en los fotosistemas que tienen un centro de reacción tipo I, en tanto que las bacterias púrpura y las bacterias filamentosas verdes usan fotosistemas con un centro de reacción tipo II. Las cianobacterias, la clase más abundante de bacterias fotosintéticas, usan los fotosistemas I y II acoplados en serie. Este sistema acoplado se parece al que se encuentra en algas y plantas.

A. Fotosistema II

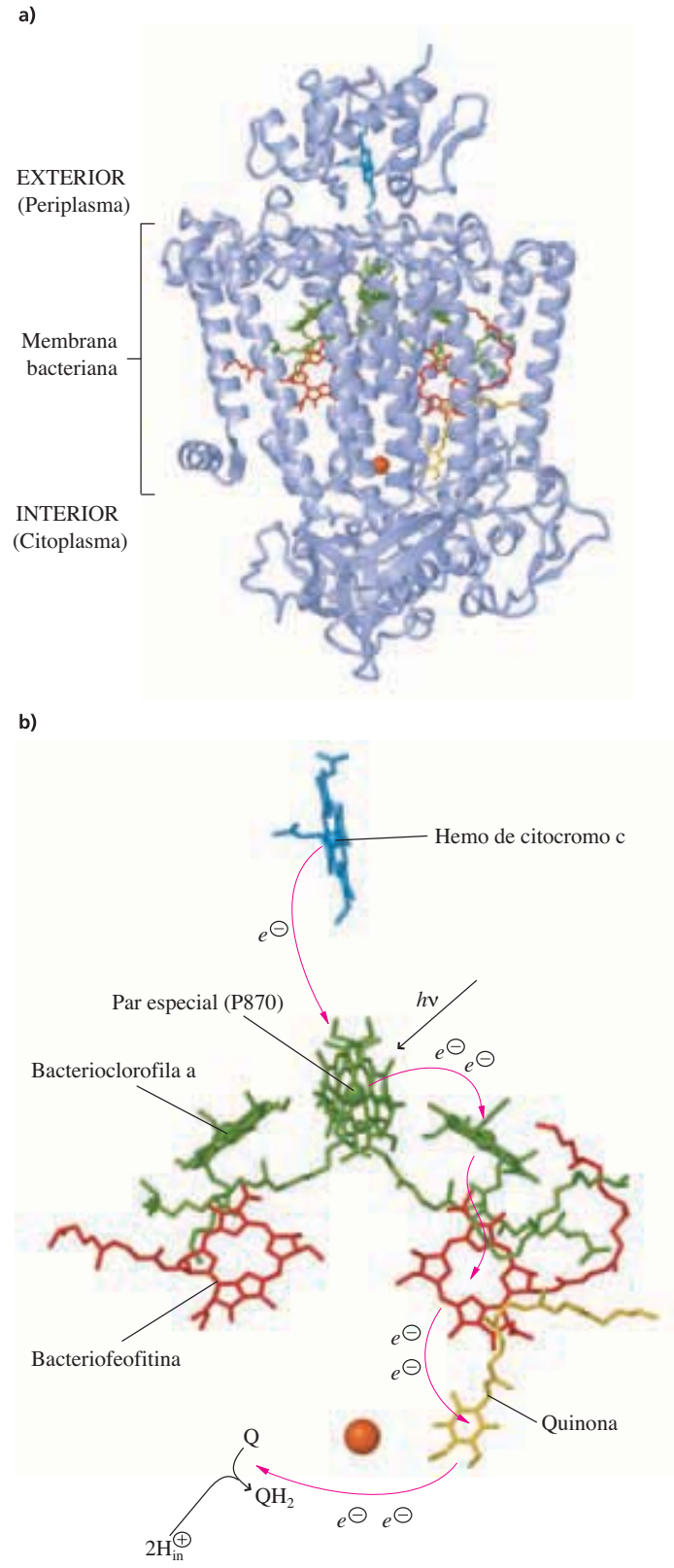
Se empezará describiendo la fotosíntesis en las bacterias púrpura y las filamentosas verdes. Esas especies de bacterias son anaeróbicas estrictas; no pueden sobrevivir en presencia de oxígeno. Por lo tanto, no desprenden oxígeno como subproducto de la fotosíntesis, ni lo consumen en el transporte de electrones respiratorio. Las bacterias púrpura y las bacterias sulfurosas verdes tienen fotosistemas con un centro de reacción del tipo II. Esos complejos de membrana se llaman con frecuencia centro bacteriano de reacción (BRC, *bacterial reaction center*), pero ese nombre engaña, porque las bacterias también contienen el otro tipo de centro de reacción. Aquí se nombrará fotosistema II, porque se relaciona evolutivamente con el fotosistema II de las cianobacterias y los eucariotas.

La estructura del fotosistema en las bacterias púrpura se ve en la figura 15.5 de la página siguiente. Las moléculas de pigmento en el centro interno de reacción tipo II forman una cadena de transferencia de electrones con dos ramificaciones. El par especial de bacterioclorofilas (P870) está ubicado cerca de la superficie periplásmica (exterior) de la membrana. Cada ramificación contiene una molécula de bacterioclorofila *a* y una de bacteriofeofitina. La ramificación derecha, en la figura 15.5b, termina en una molécula de quinona, fuertemente enlazada, en tanto que la posición equivalente en la ramificación izquierda está ocupada por una quinona unida débilmente que se puede disociar y difundir dentro de la bicapa lipídica.

La estructura del fotosistema de la bacteria púrpura *Rhodopseudomonas viridis* se muestra en la figura 4.25f.

La transferencia de electrones comienza con la liberación de un electrón excitado del P870 después de absorber un fotón de luz, o de la transferencia de la energía de excitación desde los pigmentos antena. (Las moléculas de pigmento antena no se ven en la figura 15.5). Entonces, los electrones pasan exclusivamente por la ramificación derecha del complejo en el centro de reacción. Eso da como resultado la reducción de la molécula de quinona enlazada. De ahí, los electrones pasan a la quinona en el extremo opuesto del complejo. Esta transferencia está mediada por un solo átomo de hierro enlazado en el eje central, cerca del lado citoplásmico de la membrana. La quinona móvil (Q) se reduce

Figura 15.5 ▶
Fotosistema II en la bacteria púrpura *Rhodobacter spaeroides.* **a)** El interior de la estructura consiste en dos subunidades homólogas del polipéptido que abarcan la membrana. Cada subunidad tiene cinco α hélices que atraviesan la membrana. Las moléculas de transferencia de electrones en el centro de reacción están emparedadas entre los polipéptidos del interior. El citocromo *c* se une al PSII en el lado periplásmico de la membrana (arriba). Una subunidad adicional cubre las subunidades interiores en la superficie citoplásmica (abajo). [PDB 1L9B] **b)** El centro de reacción tipo II contiene la cadena de transferencia de electrones. El par especial (P870) está cerca de la superficie periplásmica, cerca del grupo hemo del citocromo *c.* Cuando se absorbe la luz, los electrones son transferidos, uno por uno, del P870 a la BClf *a*, a la BPh y a una quinona enlazada, y de allí a una quinona ubicada en un sitio débilmente enlazado, junto al átomo central del hierro (anaranjado). Los electrones se regresan al P870 desde el citocromo *c.* (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).



a QH_2 en un proceso de dos pasos, a través de la transferencia secuencial de dos electrones, y la toma de dos $H^{\oplus}$ del citoplasma. Se absorben dos fotones de luz por cada molécula de QH_2 producida. Es probable que los centros de reacción tipo II modernos hayan evolucionado desde un sistema más primitivo, donde se transferían electrones a lo largo de ambas ramificaciones para producir QH_2 en los dos sitios Q.

La QH_2 se difunde dentro de la bicapa lipídica hacia el complejo de citocromo *bc* (complejo III) del sistema de transporte de electrones respiratorio en la bacteria. Es el mismo complejo que se describió en el capítulo anterior (sección 14.7). El complejo de citocromo *bc* cataliza la oxidación de QH_2 y la reducción de citocromo *c*; la enzima es ubiquinol:citocromo *c* oxidorreductasa. Esta reacción se acopla a la transferencia de $H^{\oplus}$ desde el citoplasma hasta el espacio periplásmico mediante el ciclo Q. El gradiente de protones que resulta impulsa la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i, catalizada por ATP sintasa (figura 15.6).

Las moléculas de citocromo *c* (Fe^{2+}) producidas por el complejo de citocromo *bc* reducen al par especial de moléculas de clorofila $P870^{\oplus}$. El citocromo *c* se difunde dentro del espacio periplásmico encerrado por las dos membranas que rodean a la célula bacteriana. El efecto neto es que los electrones van y vienen del PSII al complejo de citocromo *bc*. La estructura que se ve en la figura 15.5 incluye una molécula de citocromo *c* enlazada, con su grupo hemo ubicado cerca del par especial P870 para facilitar la transferencia de electrones.

El movimiento de los electrones entre los complejos está mediado por los cofactores móviles QH_2 y citocromo *c*, según se vio en el transporte de electrones respiratorio. La diferencia principal entre la fotosíntesis en las bacterias púrpuras y el transporte de electrones respiratorio es que la fotosínesis es un proceso cíclico. No hay ganancia ni pérdida neta de electrones hacia otras reacciones o desde ellas, y en consecuencia no se necesita una fuente externa de reacciones. El flujo cíclico de electrones es una característica de muchas reacciones de fotosíntesis, pero no de todas. El resultado de acoplar PSII y el complejo de citocromo *bc* es que la absorción de luz crea un gradiente de protones para la síntesis de ATP. Las reacciones son

PSII: $2\ P870 + 2\ \text{fotones} \longrightarrow 2\ P870^{\oplus} + 2\ e^{\ominus}$

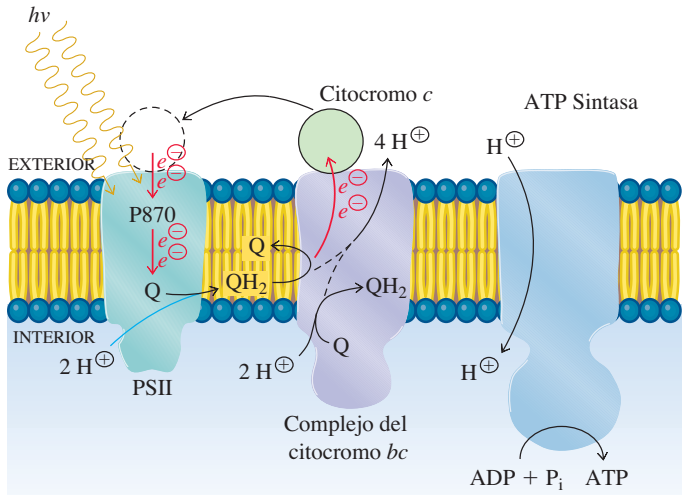
$Q + 2\ e^{\ominus} + 2\ H^{\oplus}_{int} \longrightarrow QH_2$

Cit *bc*: $2\ QH_2 + 2\ \text{cit}\ c\ (Fe^{3+}) \longrightarrow 2\ Q + 2\ \text{cit}\ c\ (Fe^{2+}) + 4\ H^{\oplus}_{ext} + 2\ e^{\ominus}$

$Q + 2\ e^{\ominus} + 2\ H^{\oplus}_{int} \longrightarrow QH_2$

PSII: $2\ \text{cit}\ c\ (Fe^{2+}) + 2\ P870^{\oplus} \longrightarrow 2\ \text{cit}\ c\ (Fe^{3+}) + 2\ P870$

Suma: $2\ \text{fotones} + 4\ H^{\oplus}_{int} \longrightarrow 4\ H^{\oplus}_{ext}$ **(15.2)**



◀Figura 15.6
Fotosíntesis en las bacterias púrpura. Los pigmentos del complejo PSII absorben luz y dan lugar a la transferencia de electrones del P870 para formar QH_2 por vía de la cadena de transferencia de electrones en el centro de reacción. QH_2 se difunde hacia el complejo del citocromo *bc* donde los electrones son transferidos al citocromo *c*. Esta reacción se acopla a la transferencia de protones a través de la membrana. El gradiente de protones impulsa la síntesis de ATP. El citocromo *c* reducido se difunde dentro del espacio periplásmico hacia el PSII, donde reduce al $P870^{\oplus}$. Las reacciones del ciclo Q se ven con más detalle en la figura 14.11. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

(Las reacciones del citocromo *bc* son las mismas que se ven en la ecuación 14.11). Por cada dos fotones de luz que se absorben, se transfieren cuatro protones a través de la membrana. Las moléculas de ATP producidas como resultado de este ciclo se usan en las bacterias para sintetizar proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos. Así, la energía luminosa captada se usa en reacciones bioquímicas de síntesis.

B. Fotosistema I

En la figura 15.7 se ve la estructura de un PSI complejo típico. La parte central del complejo está formada por dos polipéptidos homólogos, con varias α hélices que atraviesan la membrana. Cada subunidad de este dímero tiene dos dominios: un dominio interior que se une a los pigmentos de la cadena de transferencia de electrones, del centro de reacción tipo I, y un dominio periférico, que se une a pigmentos antena. Los dominios de la proteína de centro de reacción en las subunidades de PSI se relacionan, en estructura y secuencia de aminoácidos, con los polipéptidos interiores en el PSII. Esta es una prueba sólida de que hubo un ancestro común a los centros de reacción tipo I y tipo II.

La diferencia más obvia entre PSI y PSII es la presencia de una estructura de antenas más compleja en el PSI que en el PSII. El complejo de antena en el PSI está empacado con moléculas de clorofila y pigmento carotenoide. El ejemplo que muestra la figura 15.7 es de las cianobacterias, cuyos complejos PSI contienen 96 clorofilas y 22 carotenoides. Muchas de las moléculas recolectoras de luz están unidas fuertemente a otras subunidades de polipéptido que atraviesan la membrana, y rodean las subunidades interiores. El contraste entre las estructuras de la figura 15.5 y la figura 15.7 es algo engañoso, ya que hay formas más simples del PSI en algunas bacterias, y versiones más complicadas del PSII en otras especies (véase más adelante). Sin embargo, por regla general, el PSI es mayor y más complicado que el PSII.

La organización de las moléculas de la cadena de transferencia de electrones en el PSI revela un notable paralelismo con la del PSII (figura 15.8). En ambos casos, el centro de reacción contiene dos ramificaciones cortas de moléculas de pigmento que terminan en

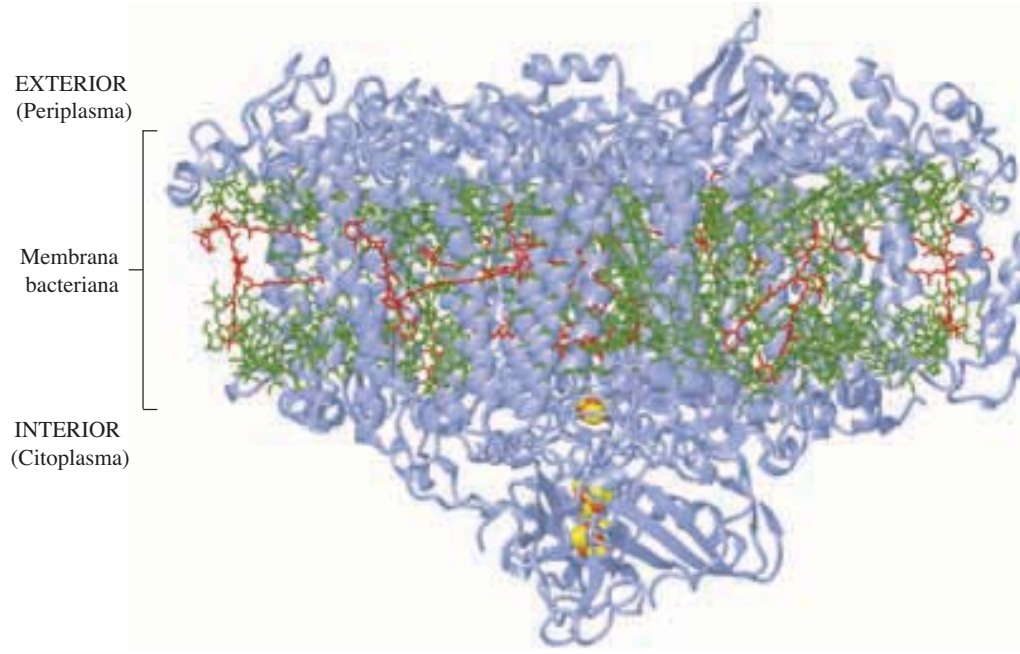
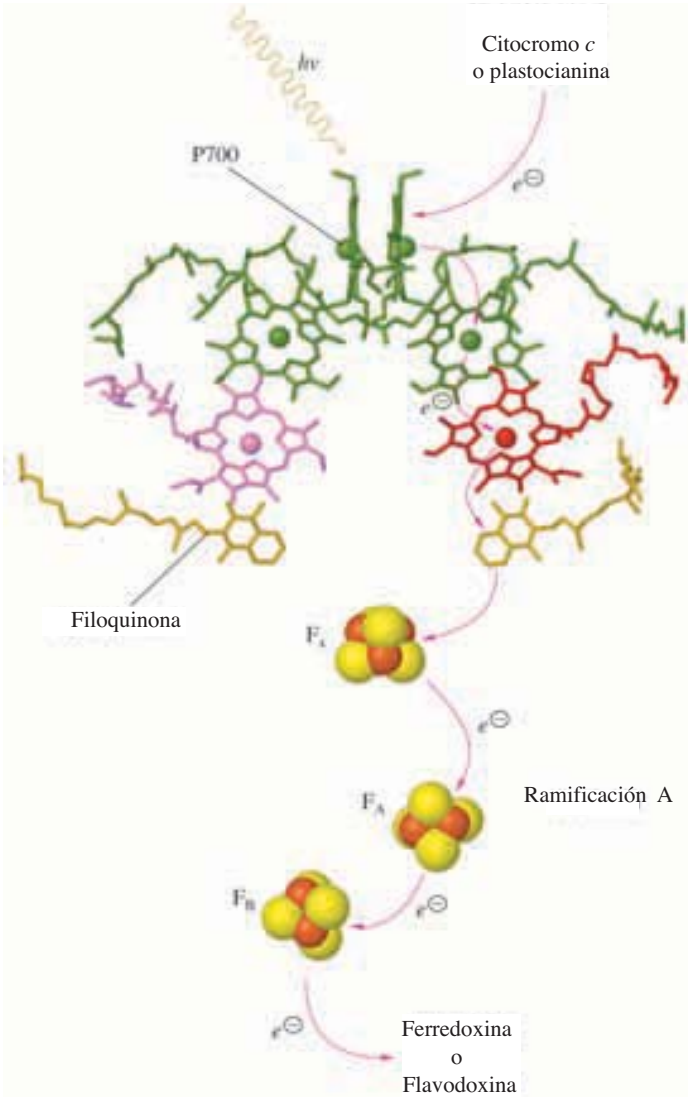


Figura 15.7 ▲
Estructura del fotosistema I (PSI) de la cianobacteria *Thermosynechococcus elongatus (Thermosynechococcus elongatus)*. El complejo contiene 96 clorofilas (en verde), 22 carotenoides (en rojo) y tres grupos hierro-azufre (en anaranjado). Hay 14 subunidades del polipéptido, y en su mayoría tienen α hélices que abarcan la membrana. [PDB 1JBO]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).



◀ Figura 15.8
Cadena de transferencia de electrones del PSI (centro de reacción tipo I). La transferencia de electrones comienza con el par especial de las moléculas de clorofila (P700) y sigue por una de las ramificaciones hasta la filoquinona. De allí, los electrones se transfieren a los grupos de Fe-S y al final a la ferredoxina. El citocromo *c* o la plastocianina reducen al $P700^{\oplus}$. [PDB1JB0]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

quinonas enlazadas. Las moléculas de pigmento PSI en el centro de reacción son de clorofila las dos, y no una de clorofila y una de feofitina, como en el PSII. En el PSI las quinonas enlazadas suelen ser filoquinonas, en tanto que en el PSII están relacionadas con la ubiquinona (o menaquinona, en bacterias). Las filoquinonas en los centros de reacción tipo I están firmemente unidas al complejo, y forman parte de la cadena de transferencia de electrones. (Recuérdese que una de las quinonas en los centros de reacción tipo II es un aceptor terminal de electrones móvil).

La filoquinona también se conoce como la vitamina K (sección 7.13D, figura 7.29).

La transferencia de electrones comienza con el par especial de moléculas de clorofila que está cerca de la superficie periplásmica de la membrana. Este par especial se llama P700, porque absorbe luz de 700 nm de longitud de onda. Las dos moléculas de clorofila no son idénticas; la que está más cerca de la ramificación A es un epímero de la clorofila *a* (bacterioclorofila *a* en las bacterias). El P700 se excita absorbiendo un fotón de luz, o por transferencia de energía de excitación desde las moléculas antena. El electrón excitado recorre entonces una de las ramificaciones de la cadena de transferencia de electrones y llega a una de las filoquinonas enlazadas. La transferencia de electrones del P700 a la filoquinona tarda unos 20 picosegundos (10^{-12} s). Es extremadamente rápida comparada con otros sistemas de transferencia de electrones. Por ejemplo, en los centros de reacción tipo II, la transferencia del P680 a la quinona enlazada dura 200 picosegundos.

A continuación los electrones son transferidos de la filoquinona enlazada a los tres grupos de Fe–S, F_X, F_A y F_B. El aceptor terminal en el PSI es la ferredoxina (o flavodoxina). La ferredoxina reducida (Fd_{red}) se transforma en el sustrato de una reacción de óxido-reducción catalizada por una enzima llamada ferredoxina:$NADP^{\oplus}$ oxidorreductasa, que se llama con más frecuencia ferredoxina:$NADP^{\oplus}$ reductasa o FNR. La enzima es una flavoproteína (que contiene FAD) y la reacción se efectúa en tres pasos, donde interviene una semiquinona intermedia (sección 7.5). El producto de la reacción es reductores equivalentes en forma de NADPH. El NADPH es el cofactor esencial en varias reacciones de biosíntesis.

Las reacciones acopladas donde participa el PSI son

PSI:

$$2\ P700 + 2\ \text{fotones} \longrightarrow 2\ P700^{\oplus} + 2\ e^{\ominus}$$
$$2\ Fd_{ox} + 2\ e^{\ominus} + \longrightarrow 2\ Fd_{red}$$

FNR:

$$Fd_{red} + H^{\oplus} + FAD \rightleftharpoons Fd_{ox} + FADH\bullet \quad \textbf{(15.3)}$$
$$Fd_{red} + H^{\oplus} + FADH\bullet \rightleftharpoons Fd_{ox} + FADH_2$$
$$FADH_2 + NADP^{\oplus} \rightleftharpoons FAD + NADPH + H^{\oplus}$$

Suma: $2\ P700 + 2\ \text{fotones} + NADP^{\oplus} + H^{\oplus} \longrightarrow 2\ P700^{\oplus} + NADPH$

Este es un proceso no cíclico. El par especial oxidado en los centros de reacción tipo I ($P700^{\oplus}$) debe ser reducido por los electrones de otra fuente, porque los de la clorofila excitada fueron transferidos finalmente al NADPH. Algunas bacterias contienen versiones del PSI que se enlazan al citocromo *c* en la superficie externa de la membrana, junto al par especial. En esas bacterias, el $P700^{\oplus}$ se reduce por el citocromo *c* reducido en forma similar a la reducción del par especial en el PSII. La fuente de electrones para el citocromo c reducido depende de la especie. En las bacterias sulfurosas verdes es de varios compuestos de azufre reducido, como H_2S y $S_2O_3^{2\ominus}$. La oxidación de estos compuestos de azufre se acopla a la transferencia de electrones al citocromo *c* mediante enzimas especiales que se encuentran en esas especies. Las bacterias sulfurosas verdes son fotoautótrofas (sección 10.3) que crecen en ausencia de oxígeno.

La transferencia no cíclica de electrones es una propiedad característica del PSI, pero también puede ser un proceso cíclico de transferencia de electrones. A veces, algunos electrones del PSI se pasan de la ferredoxina a una quinona, tal vez por la ferredoxina:quinona oxidorreductasa (ferredoxina:quinona reductasa, FQR). El quinol (QH_2) interactúa con el complejo del citocromo *bc* transfiriendo electrones por vía del

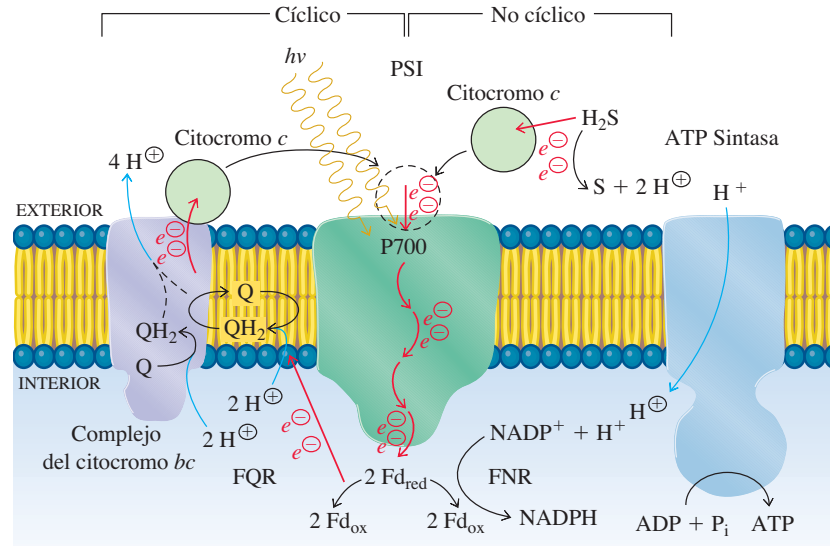


Figura 15.9 ▶
Fotosíntesis en bacterias sulfurosas verdes. La fotoactivación del P700 causa la producción de la ferredoxina reducida en el lado citoplásmico de la membrana. La ferredoxina se convierte en el donador de electrones en una reacción catalizada por la ferredoxina:$NADP^{\oplus}$ reductasa (FNR), y da como resultado la producción del NADPH en el citoplasma. También la ferredoxina puede reducir Q a QH_2 en una reacción catalizada por la ferredoxina:quinona reductasa (FQR). El complejo del citocromo *bc* oxida a la QH_2 y causa la transferencia de electrones al citocromo *c* reducido y la transferencia de protones a través de la membrana. El citocromo *c* reduce en el caso normal al $P700^{\oplus}$ en el lado periplásmico de la membrana. En el proceso no cíclico, el citocromo *c* reducido se fabrica en reacciones que están acopladas a la oxidación de los compuestos sulfurados, como H_2S. La transferencia de electrones se indica con flechas rojas. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

citocromo *bc* al citocromo *c*, y el citocromo *c* reduce al $P700^{\oplus}$ (figura 15.9). Este proceso cíclico se parece mucho a las reacciones acopladas donde participa el PSII. Permite la síntesis de ATP mediada por luz, porque el paso de electrones por el citocromo *bc* se asocia a la traslocación de protones a través de la membrana por el ciclo Q. En la mayor parte de los casos predomina el proceso no cíclico, y se produce NADPH; sin embargo, si el NADPH no se puede usar en forma eficiente en reacciones de biosíntesis, los electrones serán transferidos a través del citocromo *bc* para producir ATP.

Se puede usar directamente la ferredoxina reducida en otras rutas, sobre todo en la fijación del nitrógeno (sección 17.1).

C. Fotosistemas acoplados y citocromo *bf*

Las membranas de cianobacterias contienen el PSI y el PSII al mismo tiempo. Los dos fotosistemas están acoplados en serie para producir tanto NADPH como ATP como respuesta a la luz. Las reacciones de fotosíntesis en las cianobacterias se ilustran en la figura 15.10. El PSII absorbe luz y causa la excitación del P680 y la transferencia de un electrón a una quinona móvil, llamada plastoquinona (PQ, figura 7.30). A continuación, los electrones se transfieren a un complejo del citocromo *bf* parecido al del citocromo *bc* en el transporte de electrones respiratorio. Dentro del citocromo *bf*, el transporte de electrones se acopla al movimiento de $H^{\oplus}$ a través de la membrana, en un ciclo fotosintético Q. El acoplamiento del PSII y un complejo del citocromo *bf* se parece, en principio, a las reacciones de fotosíntesis en las bacterias púrpura, pero con una gran diferencia: en las bacterias púrpura los electrones se regresan al PSII por el aceptor terminal de electrones en el complejo del citocromo *bc* (citocromo *c*), en tanto que en las cianobacterias los electrones pasan al PSI. El aceptor terminal de electrones del complejo único del citocromo *bf* puede ser el citocromo *c* o una proteína azul con contenido de cobre, llamada plastocianina (PC). El citocromo *c* reducido y la plastocianina reducida son portadores móviles que se unen a la superficie externa (periplásmica) del PSI y reducen al $P700^{\oplus}$. (La mayor parte de las cianobacterias y las algas usan el citocromo *c*, en tanto que algunas cianobacterias y todas las plantas usan la plastocianina como aceptor terminal de electrones en el complejo del citocromo *bf*.)

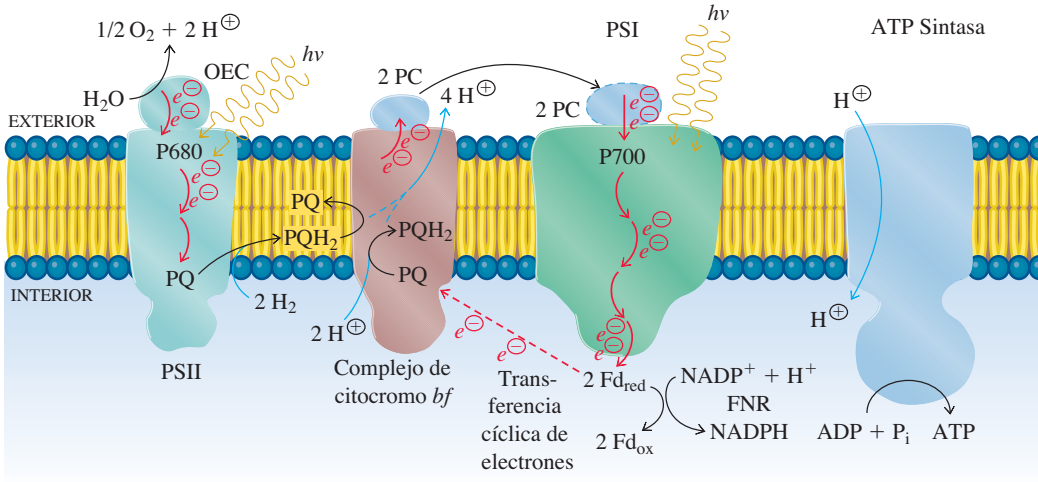


Figura 15.10 ▲
Fotosíntesis en cianobacterias. La luz (flechas onduladas) es capturada y usada para impulsar el transporte de electrones (obtenidos del agua) desde el PSII hasta el PSI y la ferredoxina, pasando por el complejo del citocromo *bf*. Este proceso puede generar el NADPH y un gradiente de concentración de protones que se usa para impulsar la fosforilación del ADP. Por cada molécula de agua oxidada a $\frac{1}{2}O_2$ por el complejo de evolución de oxígeno (OAC), se reduce una molécula de $NADP^{\oplus}$ a una de NADPH. Para simplificar, se muestran el PSI, el PSII y el citocromo *bf* cercanos entre sí en la membrana plasmática, pero en la mayor parte de las especies están dentro de las estructuras de la membrana interna. La plastoquinona (PQ) es el portador móvil entre el PSII y el complejo del citocromo *bf*. En este ejemplo, la plastocianina (PC) es el portador móvil entre el complejo del citocromo *bf* y el PSI. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

Se ha determinado la estructura del complejo fotosintético del citocromo *bf* mediante cristalografía de rayos X (figura 15.11). Contiene un citocromo *b* con dos centros de reacción del citocromo, cuyo papel en el ciclo Q es similar al del citocromo *b* en el complejo del citocromo *bc* (complejo III) en el transporte de electrones respiratorio. Una proteína de Rieske, de hierro-azufre (ISP), transporta electrones de uno de los sitios del citocromo *b* al citocromo *f*, y del citocromo *f* reducido pasa los electrones a la plastocianina. El citocromo *f* (*f* viene de *feuille*, "hoja" en francés) es una proteína distinta que no se relaciona con el citocromo c_1 del complejo respiratorio del citocromo *bc*, pero el citocromo *b* y el ISP son homólogos de las proteínas que se encuentran en el complejo III.

El complejo del citocromo *bf* evolucionó a partir del complejo original del citocromo *bc* que estaba presente en las antiguas cianobacterias. La adaptación más importante fue el reemplazo del citocromo c_1 en el complejo *bc* bacteriano por el citocromo *f* en el complejo cianobacteriano. Este cambio permitió la transferencia de electrones a la plastocianina con cobre a través del citocromo *f*. (Recuérdese que el citocromo *c*, móvil, y no la plastocianina, es el receptor normal de electrones del complejo del citocromo *bc* En algunas especies se usa el citocromo c_6 en vez de la plastocianina como aceptor de electrones del citocromo *bf*.) La plastocianina se une en forma específica al PSI en las cianobacterias, y transfiere electrones al $P700^{\oplus}$. Eso permite el flujo unidireccional de los electrones, que es: PSII → PQH_2 → citocromo *bf* → PC → PSI → NADPH.

Las cianobacterias no contienen el citocromo *bc*. Así, el citocromo *bc* juega también un papel en el transporte de electrones respiratorio, donde sustituye al complejo III normal. La plastocianina reducida es el donador de electrones a la oxidasa terminal (complejo IV), posiblemente a través de un portador intermedio parecido al citocromo *c*. La plastoquinona es la quinona móvil, tanto en la fotosíntesis como en el transporte de electrones respiratorio.

La fotoactivación del PSI da como resultado la síntesis de NADPH en forma parecida a la que hay en las bacterias sulfurosas verdes. Como en estas bacterias, algunos electrones se reciclan, pero en este caso es a través del complejo del citocromo *bf*. El PSII, el citocromo *bf* y el PSI se acoplan en serie, y la transferencia de electrones al NADPH produce una deficiencia de electrones hacia $P680^{\oplus}$ en el PSII. En las cianobacterias, la reducción del $P680^{\oplus}$ se efectúa extrayendo electrones del agua, con producción de oxígeno como subproducto. La enzima que escinde al agua se llama

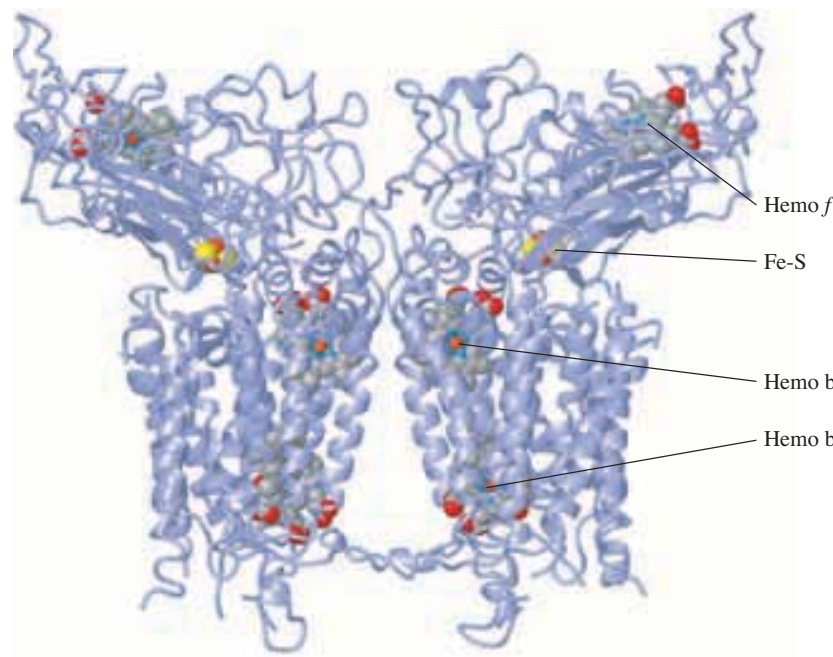


Figura 15.11 ▶
Complejo del citocromo *bf* en la cianobacteria *Mastigocladus laminosus*. El complejo contiene dos enzimas funcionales, como en el complejo III (compárese con la figura 14.10). Los componentes de la transferencia primaria de electrones son el hemo b_L y el hemo b_H (los sitios de reacciones de oxidación en el ciclo Q), el grupo hierro-azufre (Fe-S) en el ISP, y el hemo *f*. Cada unidad contiene también un clorofila ∂, un β-caroteno, y un hemo *x* poco común, cuya función todavía se desconoce (no se muestra). (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

complejo de desprendimiento de oxígeno (OEC, *oxygen-evolving complex*) y está fuertemente unida al PSII en la superficie externa de la membrana. La evolución de un complejo de desprendimiento de oxígeno en las cianobacterias primitivas fue uno de los eventos bioquímicos más importantes en la historia de la vida.

El complejo de desprendimiento de oxígeno (OEC) contiene un grupo de iones Mn^{2+}, un ion Ca^{2+} y un ion Cl^{-}. Cataliza una reacción compleja en la que se extraen cuatro electrones, uno por uno, de dos moléculas de agua. Los electrones son transferidos al par especial oxidado de moléculas de clorofila ($P680^{+}$) en el PSII. Varios laboratorios investigan el mecanismo exacto de la reacción de descomposición del agua. En principio, se parece a la reacción inversa, catalizada por el complejo IV, en la cadena de transporte de electrones respiratoria (sección 14.8). El complejo de desprendimiento de oxígeno está en la superficie exterior de la membrana, y la liberación de protones del agua contribuye a la formación del gradiente de protones a través de la membrana.

Según se dijo antes, las semejanzas entre el PSI y el PSII indican que evolucionaron a partir de un ancestro común. A través del tiempo, esos dos fotosistemas se apartaron en las especies de bacterias fotosintéticas que sólo contienen uno de los dos tipos (por ejemplo, bacterias púrpura y bacterias sulfurosas verdes). En algún momento, hace unos 2 500 millones de años, un ancestro primitivo de las cianobacterias adquirió ambos tipos de fotosistema, quizá tomando una gran parte del genoma de una especie bacteriana no relacionada. Al principio, los dos tipos de fotosistema deben haber trabajado en paralelo, pero con la evolución de un complejo fotosintético del citocromo *bf* (del citocromo *bc*) y un complejo de desprendimiento de oxígeno comenzaron a funcionar en serie. Después entró una especie de cianobacterias en una relación simbiótica con una célula eucariótica primitiva, y eso condujo a los modernos cloroplastos que se encuentran en las algas y en las plantas.

Los fotosistemas acoplados pueden capturar la energía luminosa y usarla para producir tanto ATP (del gradiente de protones) como equivalentes reductores en forma del NADPH. Ninguno de los fotosistemas, por sí mismo, puede lograr estos dos objetivos con la misma eficiencia.

El resultado neto de esta ruta lineal simplificada es la producción de una molécula de NADPH y la transferencia de cuatro protones a través de la membrana, por cada par de electrones excitados por la absorción de energía luminosa en cada fotosistema. Los dos pasos separados de excitación en el PSI y PSII requieren de un total de cuatro fotones de energía luminosa. La descomposición del agua por el OEC contribuye al gradiente de protones y produce oxígeno molecular. Las reacciones individuales se resumen como sigue:

PSII:
$$2\ P680 + 2\ \text{fotones} \longrightarrow 2\ P680^{+} + 2\ e^{-}$$
$$PQ + 2\ e^{-} + 2\ H^{+}_{int} \longrightarrow PQH_2$$

OEC:
$$H_2O \longrightarrow \tfrac{1}{2}O_2 + 2\ H^{+}_{ext} + 2\ e^{-}$$
$$2\ P680^{+} + 2\ e^{-} \longrightarrow 2\ P680$$

Cit *bf*:
$$2\ PQH_2 + 2\ \text{plastocianina}\ (Cu^{2+}) \longrightarrow 2\ PQ + 2\ \text{plastocianina}\ (Cu^{+}) + 4\ H^{+}_{ext} + 2\ e^{-}$$
$$PQ + 2\ H^{+}_{int} + 2\ e^{-} \longrightarrow PQH_2$$

PSI:
$$2\ P700 + 2\ \text{fotones} \longrightarrow 2\ P700^{+} + 2\ e^{-}$$
$$2\ Fd_{ox} + 2\ e^{-} + \longrightarrow 2\ Fd_{red}$$
$$2\ \text{plastocianina}\ (Cu^{+}) + 2\ P700^{+} \longrightarrow 2\ \text{plastocianina}\ (Cu^{2+}) + 2\ P700$$

FNR:
$$2\ Fd_{red} + H^{+} + NADP^{+} \rightleftharpoons 2\ Fd_{ox} + NADPH$$

Suma:
$$H_2O + 4\ \text{fotones} + 4\ H^{+}_{int} + NADP^{+} + H^{+} \longrightarrow \tfrac{1}{2}O_2 + 6\ H^{+}_{ext} + NADPH \qquad \textbf{(15.4)}$$

D. Potenciales de reducción y energía libre de Gibbs en la fotosíntesis

La trayectoria del flujo de electrones durante la fotosíntesis se puede representar con una figura en zigzag, llamada **esquema Z** (figura 15.12). En el esquema Z se grafican los potenciales de reducción de los componentes fotosintéticos de la transferencia de electrones en el PSI, el PSII y en el citocromo *bf*. Esto muestra que la absorción de energía luminosa convierte al P680 y al P700, moléculas de pigmento que son malos agentes reductores, a moléculas excitadas (P680* y P700*) que son buenos agentes reductores. (Recuérdese que el agente reductor cede electrones para reducir a otra molécula. En esas reacciones se oxida el agente reductor). Las formas oxidadas de las moléculas de pigmento son $P680^{\oplus}$ y $P700^{\oplus}$. La energía se recupera cuando se oxidan el P680* y el P700* y los electrones se pasan al citocromo *bf* y al NADPH, respectivamente.

Los potenciales de reducción estándar de muchos de esos componentes aparecen en la tabla 10.4. La diferencia entre dos potenciales de reducción cualquiera se puede convertir en cambio de energía libre de Gibbs estándar, como se vio en el capítulo 10. De acuerdo con la figura 15.12, se puede ver que la absorción de un fotón por el P680 o el P700 baja el potencial estándar de reducción en aproximadamente 1.85 V. En estos ejemplos, una diferencia de 1.85 V corresponde a un cambio de energía libre de Gibbs aproximado de 180 kJ mol^{-1} ($\Delta G^{\circ\prime} = 180$ kJ mol^{-1}). Este valor es casi idéntico a la

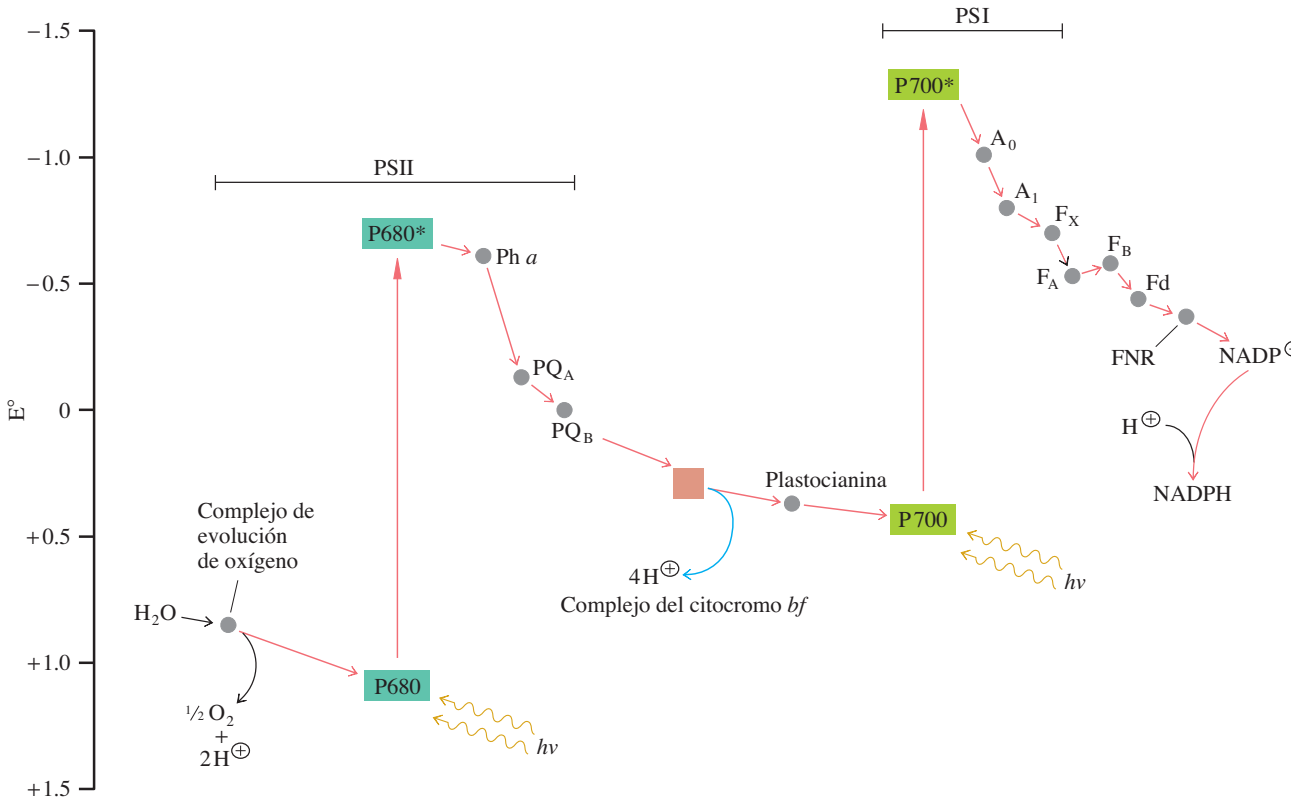


Figura 15.12 ▲
Esquema Z, que muestra los potenciales de reducción y el flujo de electrones durante la fotosíntesis en las cianobacterias. La energía luminosa es absorbida por los pigmentos de par especial P680 y P700, que se convierten en enérgicos agentes reductores, como se ve por la gran caída de potencial de reducción estándar. Los potenciales de reducción de los portadores varían con las condiciones experimentales; por consiguiente, los valores que se citan son aproximados. La ruta muestra la estequiometría cuando un *par* de electrones se transfiere del H_2O al NADPH. Abreviaturas: Ph *a* = feofitina *a*, aceptor de electrones del P680; PQ_A = plastoquinona enlazada; PQ_B = plastoquinona móvil; A_0 = clorofila *a*, el principal aceptor de electrones del P700; A_1 = filoquinona; F_X, F_B y F_A = grupos hierro-azufre; Fd = ferredoxina; FNR = ferredoxina:$NADP^{\oplus}$ reductasa.

energía calculada de un "mol" de fotones, con una longitud de onda de 680 nm (sección 15.1). Eso significa que la energía de la luz solar se convierte, en forma muy eficiente, en un cambio de potencial de reducción.

Hay muchas semejanzas entre la transferencia de electrones en la fotosíntesis y la cadena de transporte de electrones asociada a membrana que se vio en el capítulo anterior. En ambos casos, los electrones de alta energía pasan a través de un complejo de citocromos y se transportan $H^{\oplus}$ a través de una membrana. El gradiente de protones que se produce se gasta cuando la ATP sintasa produce ATP.

La estructura y la orientación del citocromo *bc* (complejo III) y el citocromo *bf* son parecidas. Ambos complejos liberan protones al espacio entre las membranas interna y externa. La orientación de la ATP sintasa también es idéntica: la "cabeza" de la estructura está en el citoplasma de las células bacterianas, o en el compartimiento interno de las células mitocondriales. En la siguiente sección se verá que esta orientación es idéntica en los cloroplastos y las mitocondrias.

La diferencia principal entre la fotosíntesis y el transporte de electrones respiratorio es la fuente de electrones y los receptores terminales de electrones. Por ejemplo, en las mitocondrias, los electrones de alta energía son suministrados por agentes reductores como el NADH ($E^{\circ\prime} = -0.32$ V) y son aceptados por el O_2 ($E^{\circ\prime} = +0.82$ V) para producir agua. En la ruta de la fotosíntesis acoplada, se invierte el flujo de electrones: el donador de electrones es el agua H_2O ($E^{\circ\prime} = +0.82$ V) y el $NADP^{\oplus}$ ($E^{\circ\prime} = -0.32$ V) es el aceptor de electrones.
Esta "inversión" del flujo de electrones es termodinámicamente desfavorable, a menos que se acople con otras reacciones que tengan mayor cambio de energía libre de Gibbs. Naturalmente, esas otras reacciones son la excitación del PSI y del PSII por la luz solar.

Para extraer electrones del agua, la célula necesita generar un poderoso agente oxidante, que tenga un potencial de reducción mayor que el de la reacción $H_2O \longrightarrow \frac{1}{2}O_2 + 2\,H^{\oplus} + 2\,e^{\ominus}$. Ese agente oxidante enérgico es el par especial de P680 después de haber cedido un electrón. La semirreacción es $P680^{\oplus} + e^{\ominus} \longrightarrow P680°$ ($E^{\circ\prime} = +1.1$ V). Nótese que este potencial estándar de reducción es mayor que el del agua, para que los electrones puedan "bajar" del agua al $P680^{\oplus}$, como se ve en la figura 15.12. El $P680^{\oplus}$ es el agente oxidante más poderoso en las reacciones bioquímicas. Es mucho más potente que el $P870^{\oplus}$ de las bacterias púrpura, aunque esas bacterias tienen un centro de reacción parecido, de tipo II.

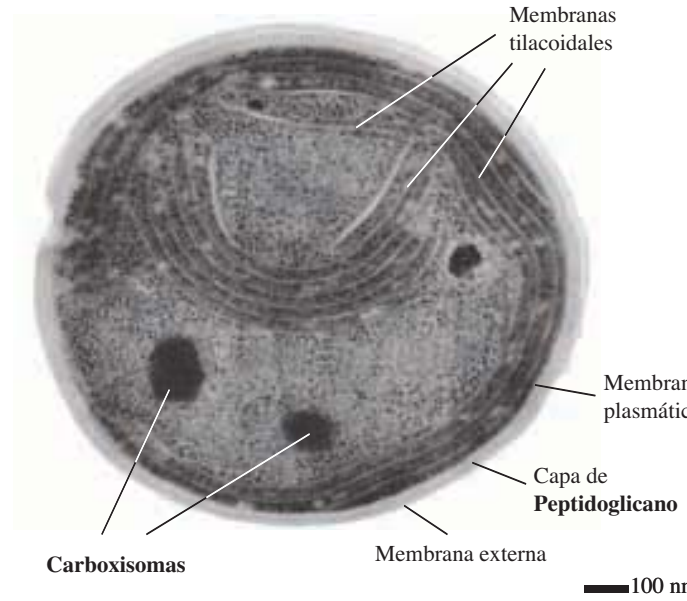
De igual modo, el P700* es un agente reductor enérgico, con un potencial de reducción menor que el del $NADP^{\oplus}$. En este caso, la absorción de un fotón de luz por el PSI produce un electrón energético que puede "bajarse" a $NADP^{\oplus}$ y crear equivalentes reductores en forma de NADPH. Así, la "inversión" del flujo de electrones en la fotosíntesis, comparado con el transporte de electrones respiratorio, se alcanza con las propiedades especiales de absorción de luz que tienen las moléculas de clorofila en los dos fotosistemas.

E. La fotosíntesis se efectúa dentro de las membranas internas

Los cuatro complejos fotosintéticos (PSI, PSII, citocromo *bf,* ATP sintasa) están embebidos en las membranas. La mayor parte de las cianobacterias contienen una compleja red interna de membranas, donde se concentran esos complejos (figura 15.13, página siguiente). Las membranas internas se llaman **membranas tilacoides.** Se forman por invaginación de la membrana plasmática interna, para formar estructuras parecidas a las crestas mitocondriales. Cuando se pliega la membrana hacia adentro, encierra un espacio llamado **lumen,** donde los protones se acumulan durante la fotosíntesis. El lumen tilacoidal puede quedar conectado al espacio periplásmico o puede formar un compartimiento interno si una burbuja de membrana se desprende de la membrana plasmática.

La red de membrana interna presenta una superficie mucho mayor a las proteínas de membrana. La consecuencia es que las cianobacterias contienen una concentración mucho mayor de complejos fotosintéticos en comparación con otras especies de bacterias fotosintéticas. Así, las cianobacterias tienen mucha eficiencia para capturar la energía luminosa y convertirla en energía química. Eso, a su vez, ha llevado a su éxito evolutivo y a la formación de una atmósfera enriquecida en oxígeno.

Figura 15.13 ▶
Estructura interna de la cianobacteria *Synechocystis* PCC 6803.



15.3 Fotosíntesis en las plantas

Hasta ahora se ha descrito la fotosíntesis bacteriana, pero muchas especies eucarióticas son capaces de efectuar la fotosíntesis. Los eucariotas fotosintetizadores con los que se está más familiarizado son las plantas de flor y otras especies terrestres, como mohos y helechos. Además de estos ejemplos obvios, hay muchas especies más simples, como las algas y las diatomeas.

En todos los eucariotas fotosintetizadores, los fotosistemas recolectores de luz están en un organelo celular específico llamado cloroplasto. Así, a diferencia del metabolismo bacteriano, no están integrados la fotosíntesis y el transporte de electrones respiratorio, porque se efectúan en distintos compartimientos (cloroplastos y mitocondrias). Los cloroplastos evolucionaron de una especie de cianobacterias que entró en una relación de simbiosis con una celda eucariótica primitiva, hace más de dos mil millones de años. Los modernos cloroplastos todavía retienen una forma reducida del genoma bacteriano original. Este ADN contiene muchos de los genes para las proteínas de la fotosíntesis, y genes para algunas de las enzimas que intervienen en la fijación del CO_2. La transcripción de esos genes y la traducción de su mARN se parecen a los mecanismos procarióticos que se describirán en los capítulos 21 y 22. Este sabor procariótico de la expresión del gen de cloroplastos refleja el origen evolutivo en las bacterias.

En el mundo actual, un gran porcentaje $(\sim 70\%)$ del oxígeno atmosférico total es producido en la fotosíntesis por las plantas terrestres, en forma específica en los bosques tropicales de lluvia. Casi todo el alimento para los animales proviene en forma directa, o indirecta, de las plantas, y la síntesis de esas moléculas de alimento se basa en la energía de la luz solar.

A. Cloroplastos

El cloroplasto está encerrado por una doble membrana (figura 15.14, página 462). Como en las mitocondrias, la membrana externa está expuesta al citoplasma, y la membrana interna forma estructuras internas muy plegadas. Durante la fotosíntesis, los protones se traslocan del interior del cloroplasto, llamado el **estroma,** al compartimiento entre las membranas interna y externa.

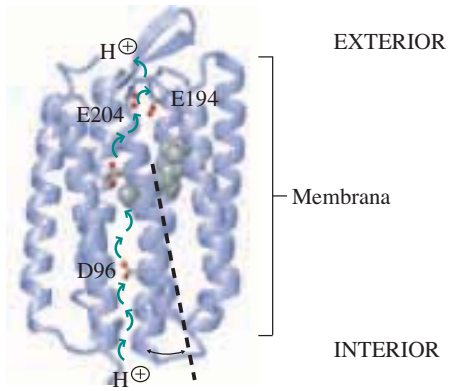
La membrana interna invaginada se llama membrana tilacoidal. Recuérdese que las cianobacterias poseen una membrana tilacoidal parecida (figura 15.13). En el cloroplasto,

RECUADRO 15.1 Bacteriorrodopsina

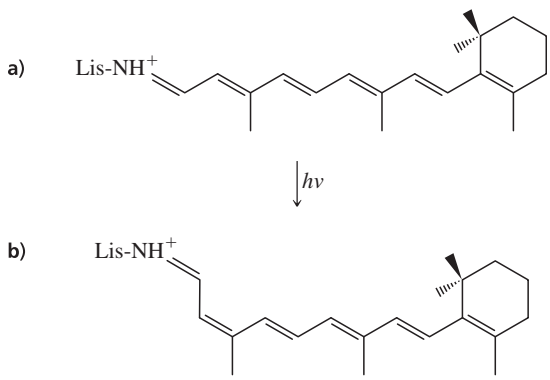
La bacteriorrodopsina es una proteína de membrana que se encuentra en unas pocas especies especializadas de arqueobacterias, como *Halobacterium salinarium*. Esta proteína tiene siete α hélices que atraviesan la membrana, y forma un canal en ella. (Véase la estructura de cinta abajo). Una sola molécula de retinal se une en forma covalente a una cadena lateral de la lisina en la mitad del canal. La configuración normal del retinal es toda *trans*, pero cuando absorbe un fotón de luz se convierte a la configuración 13-*cis* (véase la estructura abajo). El cambio de configuración inducido por la luz se acopla a la desprotonación y reprotonación del átomo de nitrógeno.

Cuando se absorbe la luz, el cambio de configuración a 13-*cis*-retinal libera un protón que entonces sube por el canal para ser liberado en el exterior de la membrana. Este protón es sustituido por uno que se toma del citosol, y la configuración del retinol se regresa a la forma toda trans. Por cada fotón de luz que absorbe la bacteriorrodopsina, un solo protón se trasloca a través de la membrana.

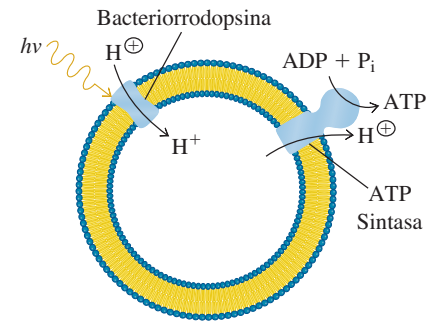
La bacteriorrodopsina crea un gradiente de protones inducido por la luz, que impulsa la síntesis de ATP por la ATP sintasa. Así, el sistema simple de bacteriorrodopsina se parece, en principio, a los fotosistemas más complejos (y más eficientes). El acoplamiento de bacteriorrodopsina y ATP sintasa se puede demostrar en forma directa al sintetizar, en forma artificial, vesículas de lípido que contengan ambos complejos. Con la orientación que se muestra abajo, las vesículas sintetizarán ATP a partir de ADP + P_i cuando se iluminan. Este experimento, hecho por Efraim Racker y sus colegas, en 1974, fue una de las primeras confirmaciones de la teoría quimiosmótica.



▲ Bacteriorrodopsina. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).



▲ Dos configuraciones de retinal-lisina en la bacteriorrodopsina. **a)** Retinal todo trans. **b)** 13-*cis*-Retinal. La configuración pasa de la forma toda *trans* a la forma 13-*cis* cuando se absorbe un fotón de luz.



▲ La bacteriorrodopsina crea un gradiente de protones que impulsa la síntesis de ATP. Se crearon vesículas artificiales de lípido con contenido de bacteriorrodopsina y ATP sintasa con la orientación que se muestra. Cuando se iluminaron estas vesículas, la bacteriorrodopsina bombeó protones al interior de la vesícula, y el gradiente de protones resultante activó la ATP sintasa.

esta membrana forma una red de láminas dentro del organelo. A medida que se desarrolla el cloroplasto, crecen proyecciones de esas hojas y forman estructuras discoidales aplanadas. Esas estructuras discoidales se apilan una sobre la otra, como una pila de monedas, para formar **grana** (*granos*, en latín; singular: *granum*). Un cloroplasto típico contiene docenas de grana o discos apilados de membranas tilacoidales. En los cloroplastos maduros, los grana están conectados entre sí por hojas delgadas de membrana tilacoidales llamadas tilacoides de estroma. Las membranas tilacoidales de estroma dentro de una pila están en contacto estrecho con las membranas que están inmediatamente arriba y abajo de ellas.

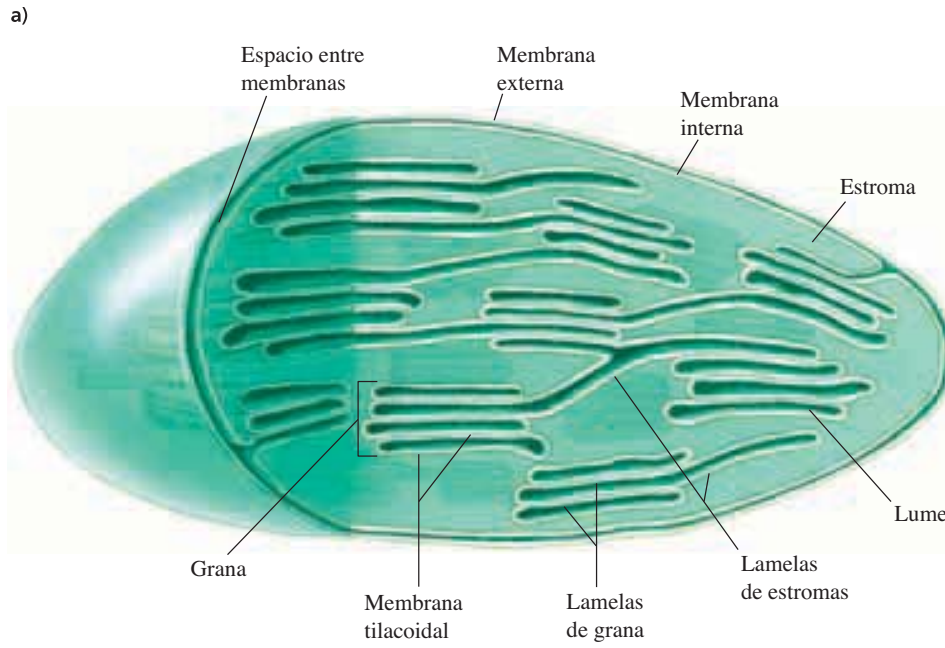


Figura 15.14 ▲
Estructura del cloroplasto. **a)** Ilustración. **b)** Micrografía electrónica de un corte transversal de un cloroplasto de hoja de espinaca. Se ven los granas (G), la membrana tilacoidal (T) y el estroma (S).

La organización tridimensional de la membrana tilacoidal se ve en la figura 15.15. Cada disco en la pila está conectado a los tilacoides de estroma mediante cortos puentes. Los puentes forman una hélice derecha en torno a los discos apilados. El interior de cada disco se llama lumen, y es el mismo compartimiento que la región entre las dos membranas del tilacoide de estroma. Todas las membranas tilacoidales están formadas por una invaginación de la membrana interna del cloroplasto. Eso quiere decir que el lumen equivale topológicamente al espacio entre las membranas interna y externa del cloroplasto. Las membranas tilacoidales contienen el PSI, el PSII, los complejos del citocromo *bf*, y la ATP sintasa, como en las cianobacterias. En las mitocondrias, se acumulan en

el compartimiento entre las membranas interna y externa (sección 14.3); de igual modo, en los cloroplastos se traslocan los protones al lumen tilacoidal y el espacio entre las dos membranas de los tilacoides de estroma. Es importante tener en mente que el estroma del cloroplasto equivale al citoplasma en las bacterias, y a la matriz en las mitocondrias.

Figura 15.15 ▲
Organización de discos apilados en un grana y su conexión con los tilacoides de estroma. [Adaptado de Staehlin, L. A. (2003) Chloroplast structure: from chlorophyll granules to supra-molecular architecture of thylakoid membranes. *Photosynthesis Research* 76:185-196].

B. Fotosistemas vegetales

Los complejos fotosintéticos en los cloroplastos eucarióticos evolucionaron a partir de los complejos presentes en las cianobacterias primitivas. El PSI del cloroplasto se parece, estructural y funcionalmente, a su ancestro bacteriano. La única diferencia estructural es que el PSI eucariótico contiene moléculas de clorofila, en vez de bacterioclorofila, en la cadena de transferencia de electrones del centro de reacción. La versión eucariótica oxida la plastocianina (o citocromo *c*) y reduce la ferredoxina (o la flavodoxina). El PSI eucariótico se asocia a un complejo recolector de luz llamado LHCI (de *light-harvesting complex I*) que se parece al complejo que existe en algunas bacterias.

El PSII del cloroplasto también se parece al de las cianobacterias. Los cloroplastos de plantas contienen un complejo recolector de luz llamado LHCII, que se asocia al PSII en la membrana del cloroplasto. El LHCII es una estructura grande, que contiene 140 clorofilas y 40 carotenoides, y rodea por completo al PSII. El resultado es que la captura de fotones en las plantas es más eficiente que en las bacterias. Las cianobacterias y los cloroplastos contienen complejos parecidos del citocromo *bf*.

La ATP sintasa en los cloroplastos se relaciona con la ATP sintasa cianobacteriana, como era de esperar. Difiere de la versión mitocondrial que se describió en el capítulo anterior. No debe sorprender, ya que la ATP sintasa mitocondrial evolucionó desde el ancestro proteobacteriano de las bacterias, y las proteobacterias tienen una relación lejana con las cianobacterias. Especies como algas, diatomeas y plantas que contienen mitocondrias y cloroplastos a la vez, tienen versiones exclusivas de ATP sintasa en cada organelo.

La ATP sintasa de cloroplasto es una CF_0F_1 ATPasa, donde "C" representa cloroplasto. La estructura molecular general (figura 15.16) es muy parecida a la de las mitocondrias, aun cuando varias subunidades de las dos enzimas están codificadas por genes distintos. Como en las mitocondrias, el componente de membrana de la ATP sintasa del cloroplasto consiste en un anillo multimérico y un tallo que entra en una estructura hexámera de cabeza. El anillo gira cuando los protones atraviesan la membrana, y se sintetiza ATP a partir de ADP + P_i por un mecanismo de cambio de enlace, como se describe en la sección 14.9.

Los lugares de varios componentes fotosintéticos en las membranas tilacoidales de estroma y granas se ven en la figura 15.17.

C. Organización de los fotosistemas del cloroplasto

La figura 15.17, en la página siguiente, ilustra los lugares, dentro de la membrana tilacoidal del cloroplasto, de los componentes fotosintéticos que atraviesan la membrana. El PSI está principalmente en el tilacoide de estroma y en consecuencia está expuesto al estroma del cloroplasto. El PSII está sobre todo en la membrana tilacoidal de los granos, alejado del estroma. El complejo de desprendimiento de oxígeno (que no se muestra en la figura 15.17) se asocia al PSII en el lado luminal de la membrana tilacoidal. El complejo del citocromo *bf* abarca la membrana tilacoidal, y se encuentra en las membranas tilacoidales de estroma y de los granos. La ATP sintasa se encuentra en forma exclusiva en los tilacoides de estroma, dentro del componente CF_1, el sitio de síntesis de ATP, y entra al estroma.

Las membranas de las superficies superior e inferior de cada disco en un grano están en contacto entre sí y forman una estructura de doble membrana. Esta región está densamente empacada con los complejos recolectores de luz del PSII, y sus complejos LHCII asociados. La luz atraviesa la membrana plasmática de la célula vegetal, el citoplasma y la membrana externa del cloroplasto. Cuando llega a los granos, los fotones se absorben en forma eficiente por las moléculas del pigmento que hay en la membrana.

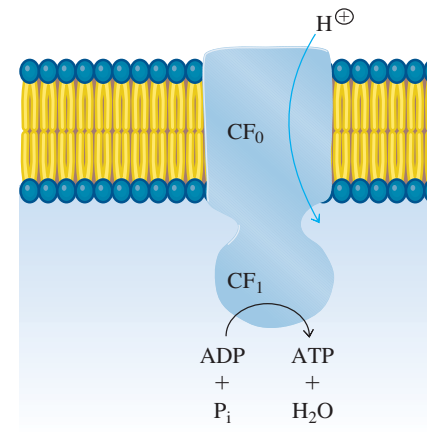


Figura 15.16 ▲
Cloroplasto ATP sintasa.

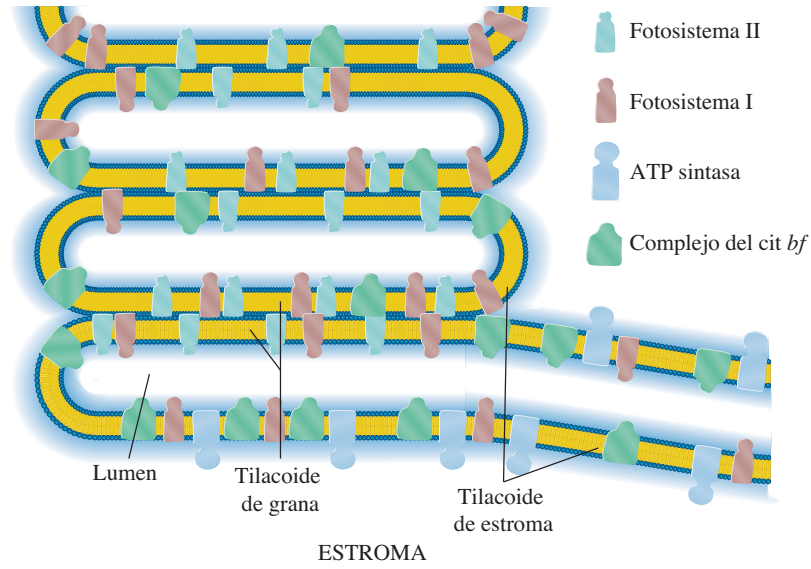


Figura 15.17 ▶
Distribución de componentes fotosintéticos que abarcan la membrana, entre el estroma y los tilacoides de grana. El PSI se encuentra principalmente en los tilacoides de estroma. El PSII se encuentra en particular en los tilacoides de grana. El complejo del citocromo *bf* se encuentra en las membranas tilacoidales, tanto de estroma como de grana. La ATP sintasa está exclusivamente en los tilacoides de estroma. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

Dentro del PSII se transfieren los electrones excitados a la PQ para formar PQH_2. Los protones para esta reacción se toman del estroma. El centro de reacción del PSII se renueva con electrones procedentes de la oxidación del agua, que se efectúa en el lumen. La PQH_2 se difunde dentro de la membrana hasta el complejo del citocromo *bf*, donde se oxida a PQ. Los protones liberados en el ciclo Q entran al lumen. Los electrones pasan a la plastocianina, que se difunde libremente en el lumen para llegar al PSI. El PSI absorbe luz y causa la transferencia de electrones, desde la plastocianina reducida a la ferredoxina. En el estroma se forma ferredoxina. Puede participar en la reducción del $NADP^{\oplus}$ a NADPH en el estroma, o servir como donador de electrones a los complejos del citocromo *bf* en la membrana tilacoidal de estroma (transporte cíclico de electrones, sección 15.2B).

Nótese que el PSII no está directamente expuesto al estroma, sino al lumen tilacoidal. El lumen equivale, topológicamente, al exterior de la membrana bacteriana, como se ve en la figura 15.10. El PSI debe exponerse al compartimento del estroma, porque produce ferredoxina que se acumula dentro de los cloroplastos. Topológicamente, el estroma equivale al citoplasma bacteriano (interior de la célula). La distribución de los complejos del citocromo *bf* se explica porque pueden recibir electrones tanto del PSII como del PSI. Los supercomplejos del PSII y del citocromo *bf* en los granos participan en la transferencia lineal de electrones, del agua a la plastocianina. En los tilacoides de estroma hay complejos de PSI, del citocromo *bf*, y de la ferredoxina:$NADP^{\oplus}$ reductasa (FNR) que intervienen en el flujo cíclico de electrones.

El gradiente de protones se usa para generar ATP. Cuando los protones se traslocan del compartimiento del lumen al estroma, se sintetiza ATP a partir de ADP y P_i en el estroma. Se acumulan tanto ATP como NADPH en el estroma, donde pueden usarse en reacciones de biosíntesis.

15.4 Fijación del CO_2: el ciclo de Calvin

La conversión reductora del CO_2 atmosférico en carbohidratos está activada por el ATP y el NADPH formados durante las reacciones luminosas de la fotosíntesis. La fijación del CO_2 y la síntesis de carbohidratos suceden en el citoplasma de las bacterias, y en el estroma de cloroplastos. Esta ruta de biosíntesis es un ciclo de reacciones catalizadas por enzimas, con tres etapas principales: 1) la carboxilación de una molécula de azúcar de cinco carbonos, 2) la síntesis reductora de carbohidratos, para usarlos en otras rutas,

y 3) la regeneración de la molécula que acepta al CO_2. Esta ruta de asimilación de carbono tiene varios nombres, como ciclo reductor de la pentosa fosfato, Ruta C_3 (el primer compuesto intermedio es una molécula de tres carbonos) y el ciclo de Calvin. (Los investigadores del laboratorio de Melvin Calvin descubrieron la ruta del carbono, usando $^{14}CO_2$ en experimentos con algas.) A esta ruta se le llamará **ciclo de Calvin**.

A. El ciclo de Calvin

El ciclo de Calvin se resume en la figura 15.18. La primera etapa es la carboxilación de la ribulosa 1,5-*bi*fosfato, reacción catalizada por la ribulosa 1,5-*bi*fosfato carboxilasa-oxigenasa, mejor conocida como Rubisco (también se le llama RuBP Casa, RuBP C/O, RuBisCo, RUBISCO, Rubisco, etc.). La segunda etapa es de reducción, donde el 3-fosfoglicerato se convierte en gliceraldehído 3-fosfato. En la tercera etapa, la mayor parte del gliceraldehído 3-fosfato se convierte en ribulosa 1,5-*bi*fosfato. Algo del gliceraldehído 3-fosfato producido en el ciclo de Calvin se consume en rutas de síntesis de carbohidratos. El gliceraldehído 3-fosfato es el producto principal de la ruta.

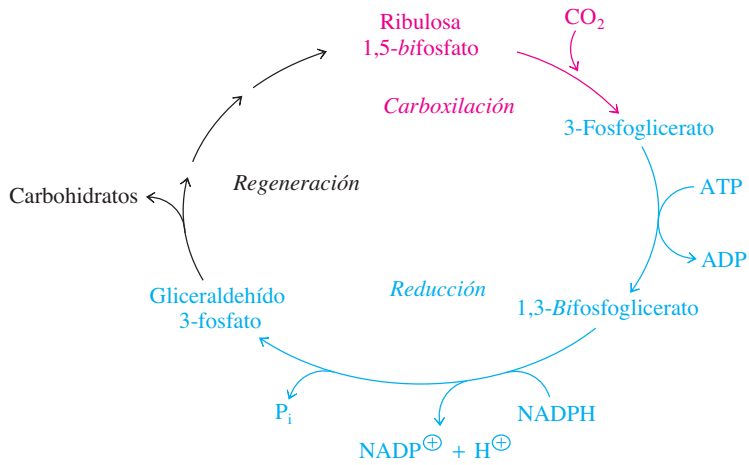
La figura 15.19, en la página siguiente, ilustra todas las reacciones del ciclo de Calvin. Allí se ven los pasos para asimilar tres moléculas de dióxido de carbono, porque el compuesto intermedio carbonado más pequeño del ciclo de Calvin es una molécula con C_3. Por consiguiente, se deben fijar tres moléculas de CO_2 para poder sacar una unidad con C_3 (gliceraldehído 3-fosfato) del ciclo sin disminuir las reservas metabólicas.

▲ Melvin Calvin (1911-1997) obtuvo el Premio Nobel de Química en 1961 por sus trabajos sobre la asimilación de dióxido de carbono en las plantas.

B. Rubisco: Ribulosa 1,5-*bi*fosfato carboxilasa-oxigenasa

La rubisco (ribulosa 1,5-*bi*fosfato carboxilasa-oxigenasa) es la enzima clave del ciclo de Calvin. Cataliza la fijación de CO_2 atmosférico en compuestos de carbono. Esta reacción implica la carboxilación del azúcar ribulosa 1,5-*bi*fosfato, con cinco carbonos, con CO_2 y la producción final de dos moléculas de tres carbonos de 3-fosfoglicerato. El mecanismo de reacción de la rubisco se ve en la figura 15.20, en la página 467.

La Rubisco forma 50% de la proteína soluble en las hojas de las plantas, por lo que es una de las enzimas más abundantes en la Tierra. Es interesante que su abundancia se deba en parte a que no es muy eficiente: el bajo número de renovación, de $\sim 3\ s^{-1}$, quiere decir que ¡se necesitan grandes cantidades de la enzima para sostener la fijación de CO_2!



◀Figura 15.18
Resumen del ciclo de Calvin. El ciclo tiene tres etapas: la carboxilación de la ribulosa 1,5-*bi*fosfato, la reducción de 3-fosfoglicerato a gliceraldehído 3-fosfato y la regeneración de la ribulosa 1,5-*bi*fosfato.

Figura 15.19 ▲
Ciclo de Calvin. Las concentraciones de los compuestos intermedios en el ciclo de Calvin se mantienen cuando sale una molécula de gliceraldehído 3-fosfato (G3P) del ciclo, después de haber fijado tres moléculas de CO_2.

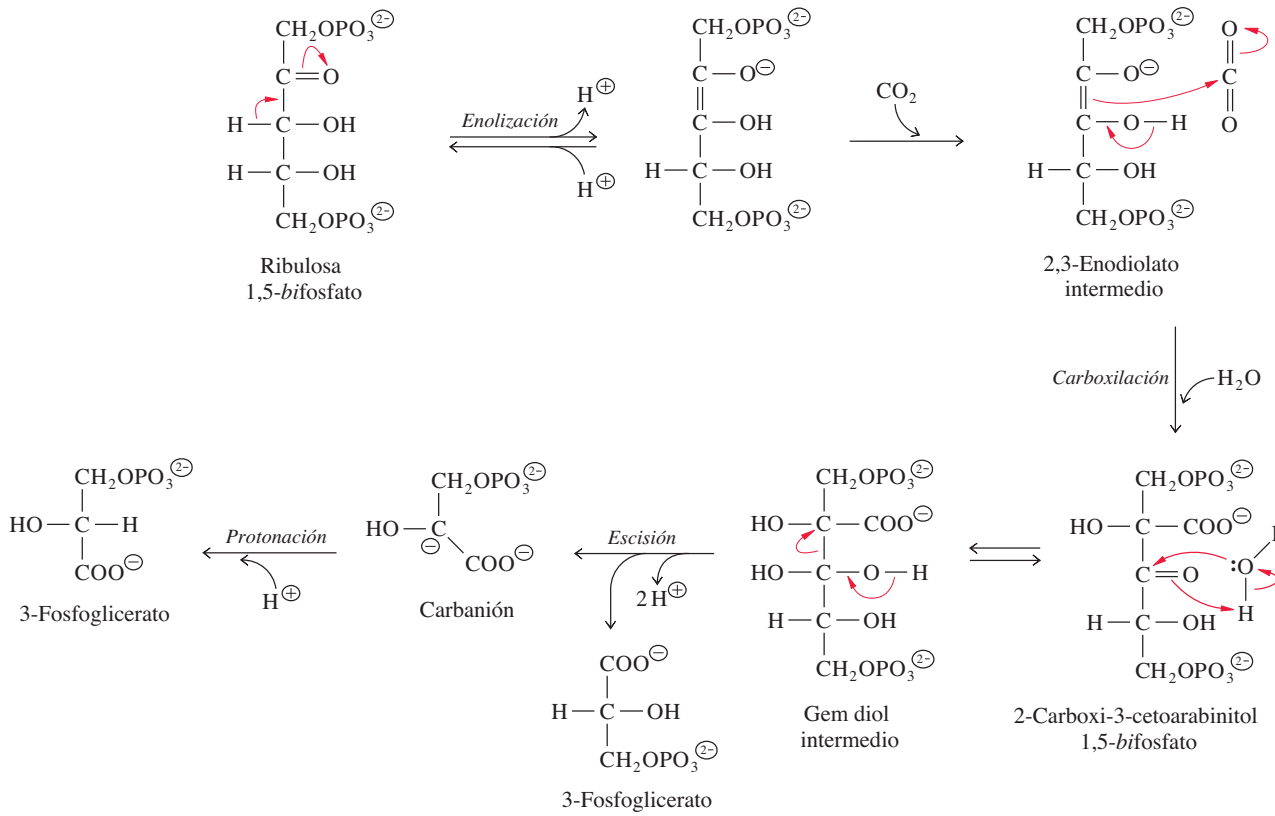


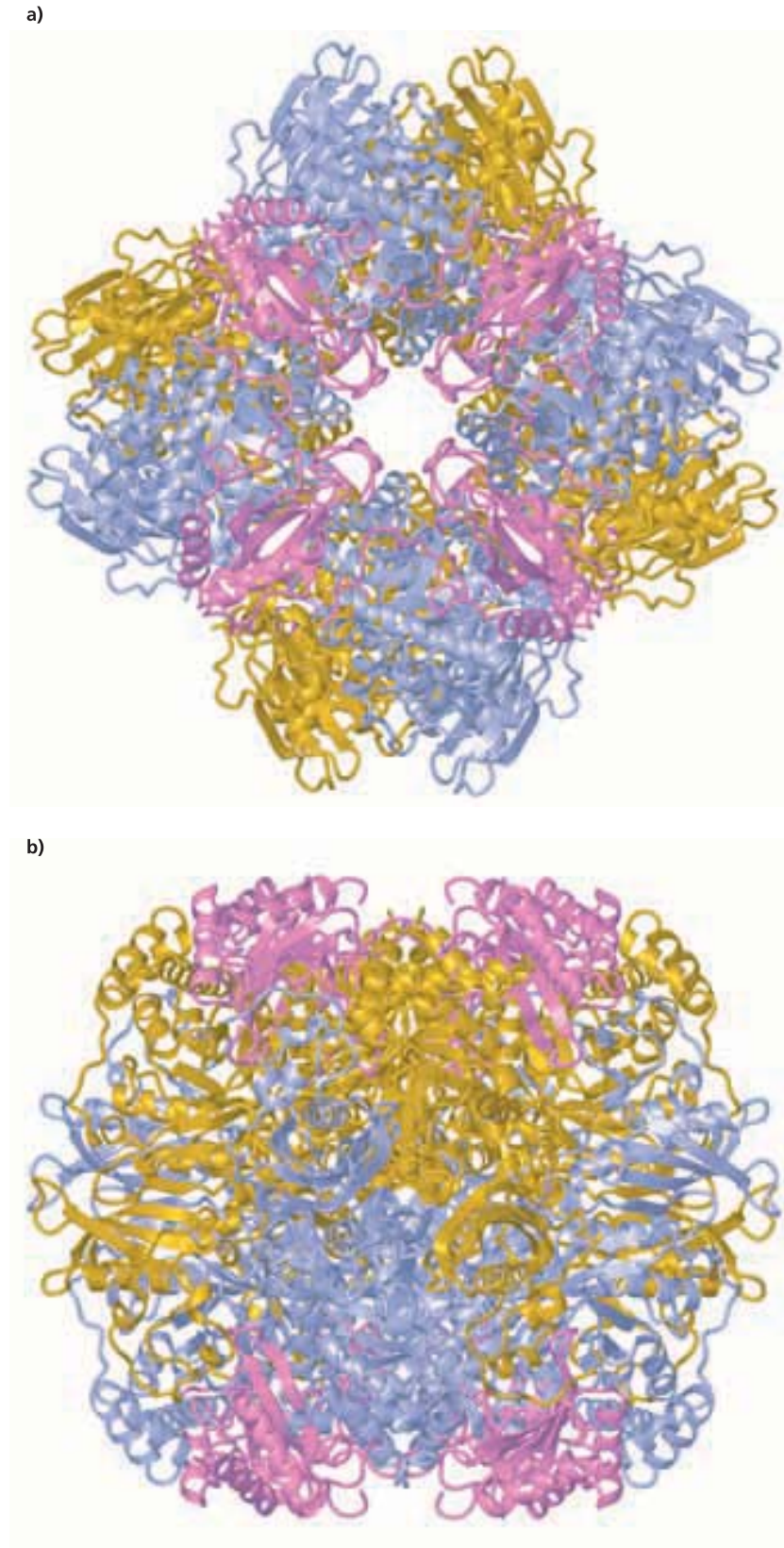
Figura 15.20 ▲
Mecanismo de la carboxilación de la ribulosa 1,5-*bi*fosfato catalizada por la Rubisco para formar dos moléculas de 3-fosfoglicerato. Se sustrae un protón del C-3 de la ribulosa 1,5-*bi*fosfato para crear un 2,3-enodiolato intermedio. El enodiolato nucleofílico ataca al CO_2 y produce 2-carboxi-3-cetoarabinitol 1,5-*bi*fosfato, que se hidrata y forma un gem diol intermedio inestable. El enlace del C-2-C-3 del intermedio se rompe de inmediato y genera un carbanión y una molécula de 3-fosfoglicerato. La protonación estereoespecífica del carbanión produce una segunda molécula de 3-fosfoglicerato. Este paso completa la etapa de fijación del ciclo RPP: se forman dos moléculas de 3-fosfoglicerato a partir de CO_2 y el azúcar ribulosa 1,5-*bi*fosfato de cinco carbonos.

La Rubisco de plantas, algas y cianobacterias está formada por ocho subunidades grandes (L, de *large*) y ocho subunidades pequeñas (S, de *small*) (figura 15.21, página siguiente). Hay ocho sitios activos que están en las ocho subunidades grandes. Se localizan cuatro subunidades pequeñas adicionales en cada lado del interior formado por las subunidades grandes. Las moléculas de Rubisco en otras bacterias fotosintéticas sólo tienen las subunidades grandes que contienen los sitios activos. Por ejemplo, en la bacteria púrpura *Rhodospirillum rubrum*, la Rubisco consiste en un simple dímero de subunidades grandes.

La versión de Rubisco en la bacteria púrpura tiene mucho menor afinidad hacia el CO_2 que las enzimas más complejas, de varias subunidades, en las otras especies, pero cataliza la misma reacción. En una espectacular demostración de esta similaridad funcional, se diseñaron genéticamente plantas de tabaco reemplazando al gen normal de la planta con el de la bacteria púrpura *Rhodospirillum rubrum*. Las plantas modificadas sólo contuvieron la forma bacteriana dimérica de la enzima. Las plantas crecieron en forma normal, y se reprodujeron siempre que estuvieran en una atmósfera con alta concentración de CO_2.

La Rubisco va y viene entre una forma activa (en la luz) y una inactiva (en la oscuridad). La Rubisco se debe activar para catalizar la fijación de CO_2. En la luz, la actividad rubisco aumenta como respuesta al pH mayor, más básico, que se desarrolla en el estroma (o en el citoplasma bacteriano) durante la traslocación de protones. Bajo condiciones alcalinas, una molécula activadora de CO_2, que no es molécula sustrato de CO_2, reacciona en forma reversible con la cadena lateral de un residuo de lisina en la

Figura 15.21 ▶
Vistas superior y lateral de la estructura cuaternaria (L_8S_8) de la ribulosa 1,5-*bi*fosfato carboxilasa-oxigenasa (Rubisco) de la espinaca (*Spinacia oleracea*). Las subunidades grandes se muestran alternativamente en amarillo y azul; las subunidades pequeñas están en púrpura. [PDB 1RCX]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).



rubisco, para formar un aducto de carbamato. El Mg^{2+} se une a este aducto de CO_2-lisina y lo estabiliza. La enzima debe ser carbamilada para efectuar la fijación de CO_2; sin embargo, el aducto de carbamato se disocia con facilidad e inactiva a la enzima. En el caso normal se inhibe la carbamilación, porque la Rubisco suele estar en una conformación inactiva. Sin embargo, durante el día, una enzima dependiente de ATP y activada por la luz, llamada Rubisco activasa, se enlaza a la Rubisco y facilita la carbamilación induciendo un cambio de conformación. Bajo estas condiciones, la Rubisco es activa.

Cuando se pone el sol, la Rubisco activasa ya no es efectiva en la activación de la Rubisco, y se detiene la fijación del CO_2. Esta regulación tiene sentido, ya que la fotosíntesis no es activa en la noche y no se producen ATP + NADPH en los cloroplastos durante la noche. Esos cofactores se requieren en el ciclo de Calvin, por lo que ese ciclo no está activo en la noche, como resultado de la regulación de la actividad Rubisco. La inhibición de la Rubisco en la oscuridad evita la acumulación ineficiente de 3-fosfoglicerato, y la dispendiosa reacción de oxigenación que se describirá en la sección siguiente.

En las plantas, un nivel adicional de inhibición es mediado por el 2-carboxiarabinitol 1-fosfato (figura 15.22). Este compuesto es un análogo del gem diol inestable de la reacción de carboxilación. Sólo se sintetiza por la noche, y se une a toda Rubisco residual carbamilada y la inhibe, asegurando así que se interrumpa el ciclo de Calvin. Algunas plantas sintetizan cantidades suficientes del inhibidor para mantener la Rubisco totalmente inactiva en la oscuridad.

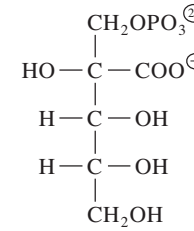
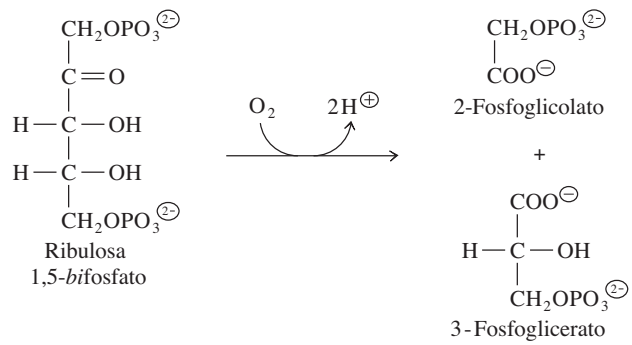


Figura 15.22 ▲
2-Carboxiarabinitol 1-fosfato.

C. Oxigenación de la ribulosa 1,5-*Bi*fosfato

Como dice su nombre completo, la ribulosa 1,5-*bi*fosfato carboxilasa-oxigenasa (Rubisco) no sólo cataliza la carboxilación, sino también la oxigenación de la ribulosa 1,5-*bi*fosfato. Las dos reacciones son competitivas: el CO_2 y el O_2 compiten para llegar a los mismos sitios activos de la Rubisco. La reacción de oxigenación produce una molécula de 3-fosfoglicerato y una de 2-fosfoglicerato (figura 15.23). La oxigenación consume cantidades importantes de ribulosa 1,5-*bi*fosfato *in vivo*. Bajo las condiciones normales de crecimiento, la velocidad de carboxilación es de tres a cuatro veces mayor que la de oxigenación.

El 3-fosfoglicerato formado en la oxigenación de la ribulosa 1,5-*bi*fosfato entra al ciclo de Calvin. El otro producto de la reacción de oxigenación va por una ruta diferente. Se metabolizan dos moléculas de 2-fosfoglicerato (C_2) en peroxisomas y mitocondrias, por una ruta oxidante (a través de glioxilato y los aminoácidos glicina y serina) para formar una molécula de CO_2 y una de 3-fosfoglicerato (C_3), que también entra al ciclo de Calvin. Esta ruta oxidante consume NADH y ATP. La absorción de O_2, que depende de la luz y es catalizada por la Rubisco, seguida por la liberación de CO_2 durante el metabolismo del 2-fosfoglicolato, se llama fotorrespiración. La reacción de oxigenación se inhibe normalmente en la oscuridad, cuando la Rubisco es inactiva. La liberación apreciable de CO_2 fijado, y el consumo de energía sin beneficio aparente para las plantas, se deben a la carencia de una especificidad absoluta del sustrato de la Rubisco, y pueden limitar los rendimientos de las cosechas.



◀Figura 15.23
Oxigenación de la ribulosa 1,5-*bi*fosfato catalizada por la Rubisco.

D. Ciclo de Calvin: Etapas de reducción y regeneración

La etapa de reducción en el ciclo de Calvin comienza con la conversión de 3-fosfoglicerato en 1,3-*bi*fosfoglicerato, dependiente de ATP. Esta reacción es catalizada por la fosfoglicerato cinasa. A continuación el NADPH (no el NADH, como en la gluconeogénesis) reduce al 1,3-*bi*fosfoglicerato, en una reacción catalizada por una isozima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. Como en la gluconeogénesis, algo del gliceraldehído 3-fosfato se rearregla y forma su isómero, la dihidroxiacetona fosfato, en una reacción catalizada por triosa fosfato isomerasa. Algo del gliceraldehído 3-fosfato sale del ciclo para usarse en la síntesis de carbohidratos, pero la mayor parte se usa en la etapa de regeneración.

En la etapa de regeneración se desvía el gliceraldehído 3-fosfato y va a tres ramificaciones distintas de la ruta, y se interconvierte entre azúcares fosforilados de tres, cuatro, cinco, seis y siete carbonos (figura 15.19). Dos de las reacciones, las catalizadas por aldolasa y fructosa 1,6-*bi*fosfatasa, ya se conocen porque son parte de la ruta de la gluconeogénesis (sección 12.1). Muchas de las demás reacciones son parte de la ruta normal de la pentosa fosfato (sección 12.4). El resultado neto de las reacciones del ciclo de Calvin es

$$3\ CO_2 + 9\ ATP + 6\ NADPH + 5\ H_2O \longrightarrow$$
$$\text{gliceraldehído 3-fosfato} + 9\ ADP + 8\ P_i + 6\ NADP^{\oplus} \qquad \textbf{(15.5)}$$

Se requieren ATP y NADPH para fijación de CO_2 por el ciclo de Calvin. Son los productos principales de las reacciones luminosas de la fotosíntesis. Que las necesidades de ATP sean mayores que las de NADPH es una razón por la que el flujo cíclico de electrones del PSI al citocromo *bf* sea importante en la fotosíntesis. El flujo cíclico de electrones da como resultado una mayor producción de ATP en comparación con el NADPH.

Se puede usar la ecuación 15.5 para estimar el costo de sintetizar la acetil-CoA, el sustrato para el ciclo del ácido cítrico. Recuérdese que la ruta desde gliceraldehído 3-fosfato hasta la acetil-CoA está acoplada a la síntesis de dos moléculas de NADH y dos moléculas de ATP (sección 11.2). Si las restamos del costo de fabricar gliceraldehído

RECUADRO 15.2 Construcción de una Rubisco mejor

Muchos laboratorios tratan de modificar genéticamente a las plantas para intensificar la reacción de carboxilación y suprimir la de oxigenación. Si tienen éxito, esos intentos de obtener una Rubisco mejor podrían aumentar mucho la producción alimenticia.

La enzima "perfecta" tendría una actividad de oxigenasa muy baja y una muy eficiente de carboxilasa. Los parámetros cinéticos de la actividad de carboxilasa en las enzimas Rubisco procedentes de varias especies se ven en la tabla siguiente. La baja eficiencia catalítica de la enzima se observa en los valores de k_{cat}/K_m. Esos valores se deben comparar con los de la tabla 5.2. Parece probable poder aumentar 1 000 veces la eficiencia de la carboxilasa, modificando las cadenas laterales de aminoácidos en el sitio activo.

Parámetros cinéticos de actividad de la Rubisco carboxilasa en diversas especies

Especie	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	K_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)
Tabaco	3.4	10.7	3.2×10^5
Algas rojas	2.6	9.3	2.8×10^5
Bacterias púrpura	7.3	89	8.2×10^4
Enzima "perfecta"	1070	10.7	10^8

Datos según Andrews, J. T. y Whitney, S. M. (2003). Manipulating ribulose *bis*-phosphate carboxylase/oxygenase in the chloroplasts of higher plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 414: 159-169.

Lo difícil de la modificación genética es elegir los cambios adecuados de aminoácidos. La elección se facilita con un conocimiento detallado de las estructuras de varias enzimas Rubisco, procedentes de distintas especies, y examinando los contactos entre las cadenas laterales de aminoácidos y las moléculas de sustrato. También son importantes los modelos de los estados de transición propuestos. Otros residuos clave se pueden identificar comparando la conservación de secuencias de aminoácidos en enzimas procedentes de una gran variedad de especies.

En la estrategia fundamental se supone que todavía la evolución no ha seleccionado la enzima mejor diseñada. Esta hipótesis parece razonable, porque hay muchos ejemplos de evolución en curso en la bioquímica.

3-fosfato entonces el costo total de sintetizar la acetil-CoA a partir de CO_2 es 7 ATP + 4 NAD(P)H. Esto se puede expresar como 17 equivalentes de ATP, ya que cada NADH equivale a 2.5 ATP (sección 14.11). Como la ganancia neta de la oxidación completa de la acetil-CoA por el ciclo del ácido cítrico es 10 equivalentes de ATP (sección 13.4), la ruta de biosíntesis es más costosa que la energía que se obtiene del catabolismo. En este caso, la "eficiencia" de la oxidación de la acetilCoA sólo es un 60% (10/17 = 59%), pero este valor engaña, porque en realidad es la ruta de biosíntesis (que consume 17 equivalentes de ATP) la que es compleja e ineficiente.

15.5 Metabolismo de sacarosa y almidón en las plantas

El producto principal de la fijación de carbono en la mayoría de las especies fotosintéticas es el G3P (gliceraldehído 3-fosfato). A continuación, el G3P se convierte en glucosa por la ruta de gluconeogénesis. Las hexosas recién sintetizadas se pueden usar de inmediato como sustratos en varias rutas de biosíntesis, o bien se pueden almacenar en forma de polisacáridos para usarlas después. En las bacterias, algas y algunas plantas, el polisacárido de almacenamiento es glucógeno, igual que en los mamíferos. En las plantas vasculares, el polisacárido de almacenamiento es el almidón.

En la sección 8.6A se describieron las estructuras del almidón y del glucógeno.

El almidón se sintetiza en los cloroplastos a partir de la glucosa 6-fosfato, producto principal de la gluconeogénesis (sección 12.1D). En el primer paso, la glucosa 6-fosfato se convierte a glucosa 1-fosfato en una reacción catalizada por la fosfoglucomutasa (figura 15.24). Esta es la misma enzima que la encontrada en la ruta de la síntesis del glucógeno (sección 12.5A). El segundo paso es la activación de la glucosa mediante la síntesis de la ADP-glucosa. Esta reacción es catalizada por la ADP-glucosa pirofosforilasa. La estrategia metabólica se parece a la de la biosíntesis del glucógeno, pero el compuesto intermedio clave en la síntesis del glucógeno es la UDP-glucosa. La reacción de polimerización en la biosíntesis del almidón la hace la almidón sintasa. Esta ruta consume una molécula de ATP y libera una de pirofosfato por cada residuo que se adiciona a la cadena de polisacárido en crecimiento. El ATP es suministrado por las reacciones de la fotosíntesis.

También se requiere el azúcar nucleótido ADP-glucosa para que algunas bacterias sinteticen glucógeno (sección 12.15A).

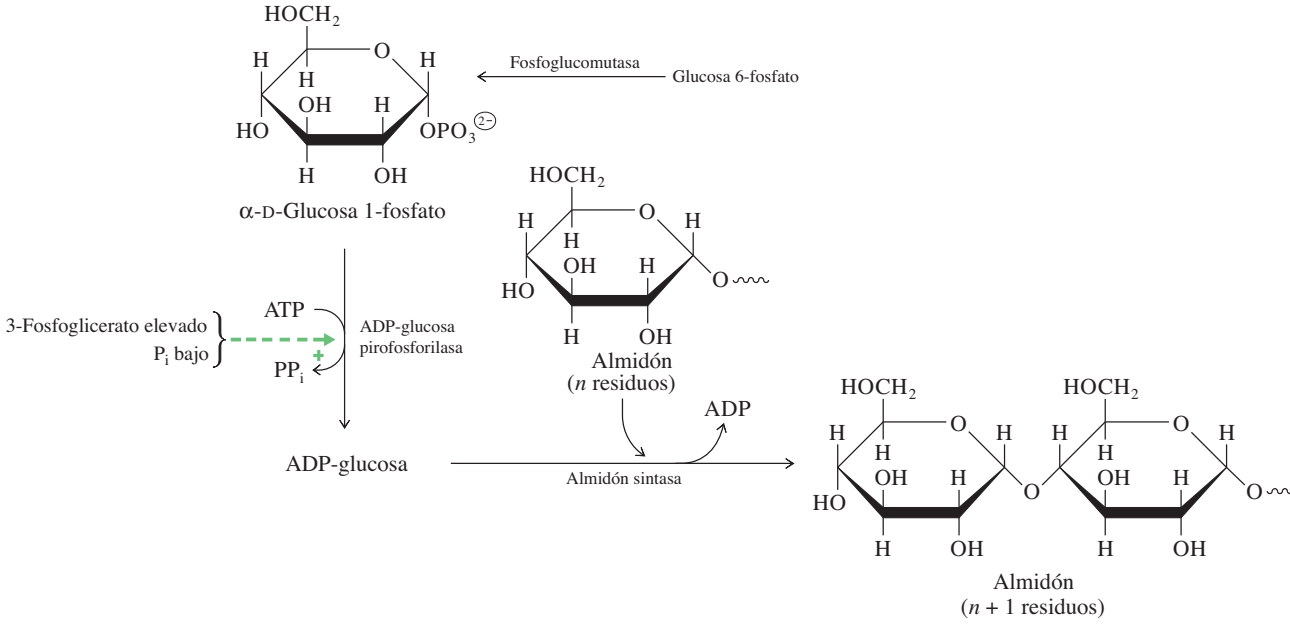


Figura 15.24 ▲
Biosíntesis de almidón en los cloroplastos. Estas reacciones agrandan la molécula creciente del almidón en una unidad de hexosa.

El almidón se sintetiza a la luz del día, cuando la fotosíntesis está activa y se acumulan las moléculas de ATP en el interior del cloroplasto. Durante la noche, el almidón se convierte en una fuente de carbono y de energía en la planta. La molécula de almidón se rompe por acción de la almidón fosforilasa y genera glucosa 1-fosfato, que se convierte en triosa fosfatos por glucólisis. Las triosa fosfatos se exportan del cloroplasto al citoplasma. En forma alternativa, el almidón se puede hidrolizar por acción de las amilasas, y formar dextrinas y al final maltosa, y después glucosa. La glucosa formada por esta ruta se fosforila por acción de la hexocinasa y entra a la ruta glicolítica.

La sacarosa es una forma móvil de carbohidrato en las plantas. Se sintetiza en el citoplasma de las células que contienen cloroplastos (por ejemplo, células de hojas) y se exporta al sistema vascular de la planta, de donde es absorbida por células no fotosintéticas (por ejemplo, de la raíz). Así, la sacarosa equivale funcionalmente a la glucosa, la forma móvil de carbohidrato en los animales que poseen un sistema circulatorio (sección 12.7).

La ruta de la síntesis de la sacarosa se ve en la figura 15.25. Cuatro moléculas de triosa fosfato producen una molécula de sacarosa. Las triosa fosfatos siguen la ruta de la gluconeogénesis, y se condensan para formar fructosa 1,6-*bi*fosfato, que se hidroliza y forma fructosa 6-fosfato. La fructosa 6-fosfato se isomeriza entonces a glucosa 6-fosfato, que sale de la ruta de la gluconeogénesis y se convierte en una α-D-glucosa 1-fosfato. La glucosa 1-fosfato reacciona con UTP para formar UDP-glucosa, que dona su grupo

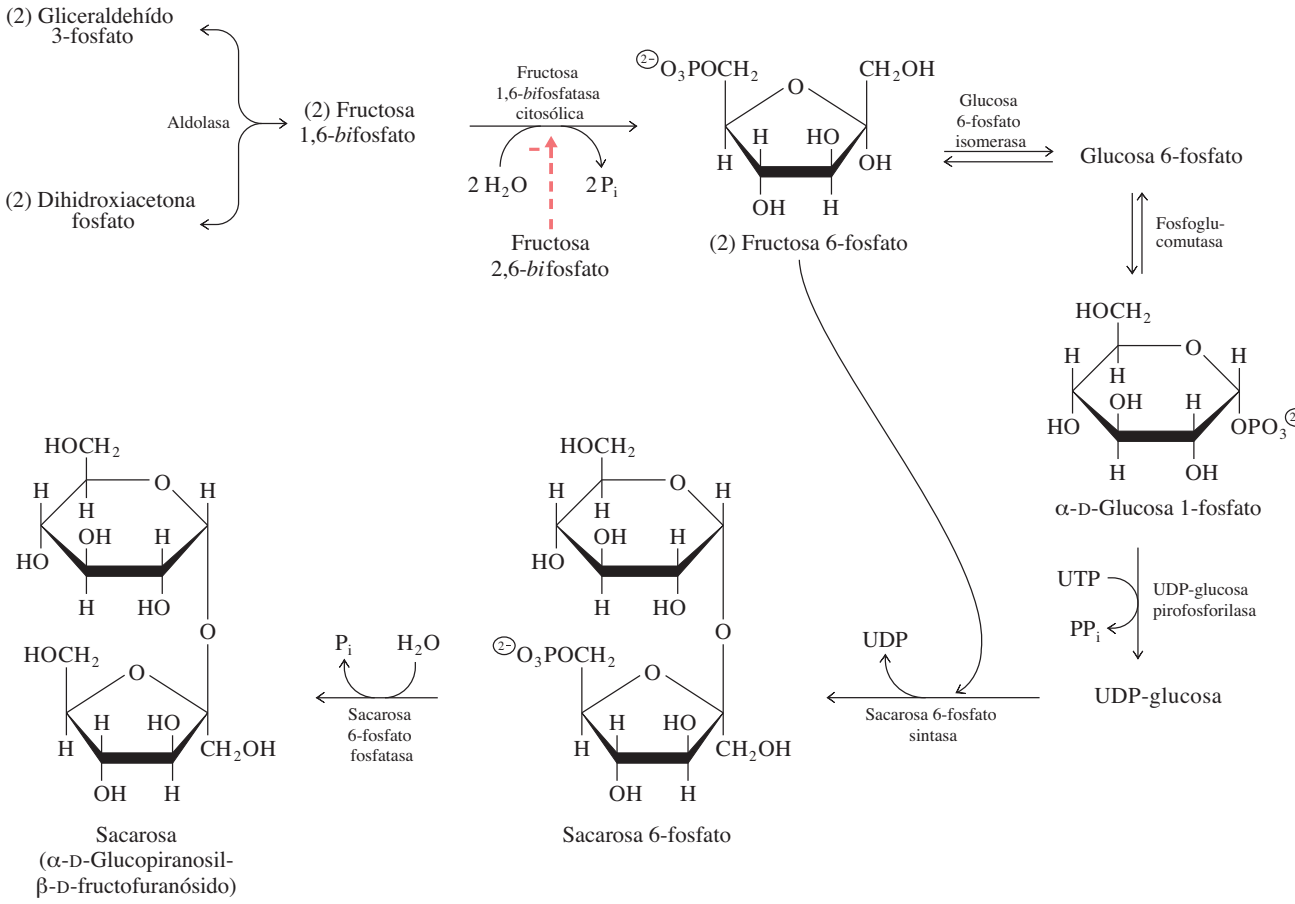


Figura 15.25 ▲
Biosíntesis de la sacarosa a partir del gliceraldehído 3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato en el citosol. Se convierten cuatro moléculas de triosa fosfato (cuatro C_3) en una molécula de sacarosa (C_{12}).

glucosilo a una molécula de fructosa 6-fosfato y forma sacarosa 6-fosfato. El paso final es la hidrólisis de la sacarosa 6-fosfato para formar sacarosa.

En la ruta de la síntesis de sacarosa se produce P_i en las reacciones catalizadas por la fructosa 1,6-*bi*fosfatasa y por la sacarosa fosfato fosfatasa, y se produce PP_i en la reacción catalizada por la UDP-glucosa pirofosforilasa. La ruta consume un equivalente de ATP (en forma de UTP). La síntesis de sacarosa y de glucógeno requieren una molécula activada de glucosa, en forma de UDP-glucosa, en tanto que en la biosíntesis del almidón se usa ADP-glucosa.

El primer paso metabólicamente irreversible en la ruta de la biosíntesis de sacarosa es la hidrólisis de fructosa 1,6-*bi*fosfato para formar fructosa 6-fosfato y P_i. La actividad de la fructosa 1,6-*bi*fosfatasa es inhibida por el modulador alostérico fructosa 2,6-*bi*fosfato (figura 11.16), mencionado ya al examinar la glicólisis y la gluconeogénesis. La concentración de fructosa 2,6-*bi*fosfato está regulada por varios metabolitos, que reflejan lo adecuado de las condiciones para la síntesis de sacarosa.

La sacarosa es tomada por las células no fotosintéticas, donde se descompone en glucosa y fructosa, que suministran energía por glicólisis y el ciclo del ácido cítrico. Estas hexosas también se pueden convertir en almidón, en aquellos tejidos que almacenan carbohidratos para uso futuro. Por ejemplo, en las células de raíz, la sacarosa se convierte en hexosas monoméricas, y estos azúcares son tomados por organelos especializados llamados **amiloplastos.** Los cloroplastos son amiloplastos modificados que carecen de los complejos fotosintéticos, pero que conservan las enzimas para la síntesis del almidón. En algunas plantas, como las patatas, nabos y zanahorias, las células de raíz pueden almacenar gigantescas reservas de almidón.

15.6 Otras rutas de fijación de carbono

Varias especies de plantas evitan la dispendiosa fotorrespiración mediante rutas secundarias para fijar carbono. El efecto neto de esas rutas secundarias es aumentar la concentración local de CO_2 en relación con la de O_2 en las células donde está activa la Irubisco. Una de esas rutas se llama ruta C_4, porque implica compuestos intermedios con C_4. Las plantas con C_4 tienden a crecer a temperaturas altas y elevadas intensidades luminosas. Comprenden especies económicamente importantes, como maíz, sorgo y caña de azúcar, y la mayor parte de las hierbas indeseables. Es esencial la eliminación de la fotorrespiración en las plantas tropicales, porque aumenta la relación

RECUADRO 15.3 Los guisantes rugosos de Gregor Mendel

Uno de los rasgos genéticos que estudió Gregor Mendel fue el de los guisantes lisos (R) y los rugosos (r). El fenotipo de guisante rugoso se debe a un defecto en el gen de la enzima ramificadora del almidón. En ausencia de esta enzima, la síntesis del almidón se bloquea en forma parcial, y los guisantes en desarrollo tienen mayor concentración de sacarosa. Eso los hace absorber más agua que los guisantes normales, y se hinchan hasta un tamaño mayor. Cuando las semillas comienzan a secarse, los guisantes rugosos pierden más agua, y su superficie exterior adquiere la apariencia rugosa.

Guisantes lisos y rugosos en una vaina. ▶

de oxigenación a carboxilación por la Rubisco, al aumentar la temperatura. Una ruta parecida en otras especies ayuda a conservar el agua, y a aumentar la eficiencia de la Rubisco. Esta ruta se llama metabolismo del ácido crasuláceo (CAM, de *crassulacean acid metabolism*) y se efectúa principalmente en las plantas suculentas.

A. La ruta C_4

En la ruta C_4 el CO_2 se concentra y se entrega a las células en el interior de la hoja, donde está activo el ciclo de Calvin. El producto principal de la fijación de carbono es un ácido con cuatro carbonos (C_4) y no uno de tres carbonos, como en el ciclo de Calvin. La ruta C_4 se efectúa en dos tipos distintos de célula dentro de la hoja. Primero se hidrata CO_2 y forma bicarbonato, que reacciona con el fosfoenolpiruvato, compuesto de C_3, para formar un ácido con C_4 en las células mesófilas (cercanas al exterior de la hoja). Esta reacción es catalizada por una isozima de la fosfoenolpiruvato (PEP) carboxilasa (sección 13.6). A continuación, se descarboxila el ácido de C_4 en las células de vaina de haz (en el interior de la hoja), que tienen una concentración de O_2 mucho menor que las células mesófilas. El CO_2 liberado es fijado por acción de la Rubisco, y se incorpora al ciclo de Calvin. El fosfoenolpiruvato se regenera a partir del producto con C_3 restante. La figura 15.26 es un esquema de la secuencia de reacciones de la ruta C_4.

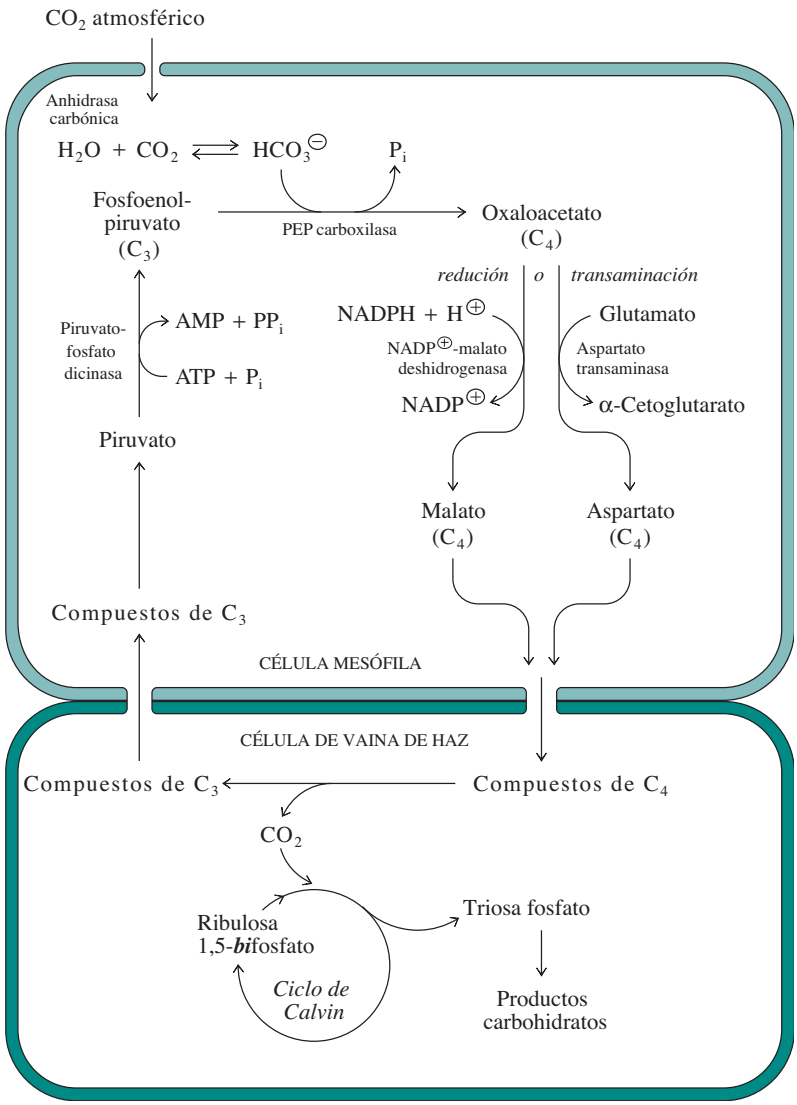
Las paredes celulares de las células internas de vaina de haz son impermeables a los gases. En esas células, la descarboxilación de los ácidos con C_4 aumenta mucho la concentración de CO_2 y se produce una relación alta de CO_2 a O_2. La actividad de oxigenasa de la Rubisco se minimiza, porque hay una cantidad insignificante de la Rubisco en las células mesófilas, y la relación de CO_2 a O_2 es extremadamente alta en las células de vaina de haz. El resultado es que las plantas de C_4 en esencia no tienen actividad fotorrespiratoria. Aunque hay un costo adicional de energía para formar fosfoenolpiruvato para la asimilación del carbono C_4, la ausencia de la fotorrespiración permite a las plantas con C_4 tener una apreciable ventaja sobre las plantas con C_3.

B. Metabolismo del ácido crasuláceo

Las plantas suculentas, como muchas especies de cacto, crecen principalmente en ambientes áridos, donde la pérdida de agua puede ser un grave problema. Se puede perder una gran cantidad de agua de los tejidos de hojas durante la fijación del carbono, porque las células deben estar expuestas al CO_2 atmosférico, y de la superficie se puede evaporar agua. En estas plantas se minimiza la pérdida de agua durante la fotosíntesis, por asimilación de carbono durante la noche. La ruta se llama metabolismo del ácido crasuláceo, porque se descubrió en la familia de las crasuláceas.

En las plantas vasculares terrestres, la superficie de la hoja con frecuencia se recubre de una capa impermeable de cera, y el CO_2 pasa por estructuras llamadas estomas para llegar a las células fotosintéticas. Los **estomas** se forman con dos células adyacentes en la superficie de la hoja. Estas células guarda (o células reniformes) definen la entrada a una cavidad forrada con células que contienen cloroplastos. La abertura entre las células guarda cambia como respuesta a flujos de iones, y de la absorción osmótica de agua resultante. El flujo de iones por las células guarda se regula por condiciones que afectan a la fijación de CO_2, como temperatura y disponibilidad de agua. Al calor del día, las plantas con metabolismo de ácido crasuláceo (CAM, de *Crassulacean acid metabolism*) mantienen cerrados sus estomas para minimizar la pérdida de agua. Por la noche, las células mesófilas absorben CO_2 por los estomas abiertos: la pérdida de agua por los estomas es mucho menor a las temperaturas nocturnas más bajas que durante el día. El CO_2 se fija por la reacción de la PEP carboxilasa, y el oxaloacetato que se forma se reduce a malato (figura 15.27).

El malato se almacena en una vacuola grande central, para mantener un pH casi neutro en el citosol, ya que la concentración celular de ese ácido puede llegar a 0.2 M al final de la noche. Las vacuolas en las plantas CAM en general ocupan más de 90% del volumen total de la célula. Durante el día, cuando se forman ATP Y NADPH por fotosíntesis,



◀Figura 15.26
Ruta de C_4. El CO_2 se hidrata a bicarbonato (HCO_3^-) en el citosol mesófilo. El bicarbonato reacciona con fosfoenolpiruvato en una reacción de carboxilación catalizada por la fosfoenolpiruvato (PEP) carboxilasa, enzima citosólica que no tiene actividad de oxigenasa. Dependiendo de la especie, el oxaloacetato producido se reduce o bien se transamina, para formar un ácido carboxílico de cuatro carbonos, o un aminoácido, que es transportado a una célula adyacente de vaina de haz, y se descarboxila. La reacción de la Rubisco fija al CO_2 liberado y entra al ciclo de Calvin. El compuesto restante de tres carbonos se vuelve a convertir al aceptor de CO_2, el fosfoenolpiruvato.

se libera malato de la vacuola y se descarboxila. Así, la gran reserva de malato acumulado por la noche abastece el CO_2 de la asimilación de carbono durante el día. Durante la descarboxilación del malato, los estomas de las hojas se cierran fuertemente para que no puedan escapar el agua ni el CO_2 de ella, y la concentración celular de CO_2 puede ser mucho mayor que la del CO_2 atmosférico. Como en las plantas con C_4, la mayor concentración interna de CO_2 reduce mucho la fotorrespiración.

En las plantas CAM, el fosfoenolpiruvato necesario para la formación de malato se deriva del almidón por glicólisis. Durante el día, el fosfoenolpiruvato que se forma durante la descarboxilación de malato (ya sea en forma directa por la PEP carboxicinasa, o por la enzima málica y la piruvato fosfato dicinasa) se convierte en almidón, por gluconeogénesis, y se almacena en el cloroplasto.

El CAM es análogo al metabolismo de C_4, porque el ácido con C_4 que se forma por acción de la PEP carboxilasa se descarboxila a continuación para suministrar CO_2 al ciclo de Calvin. En la ruta C_4, las fases de carboxilación y descarboxilación del ciclo se separan en el espacio en distintos tipos celulares, en tanto que en el CAM se separan en forma temporal, en ciclos diurno y nocturno.

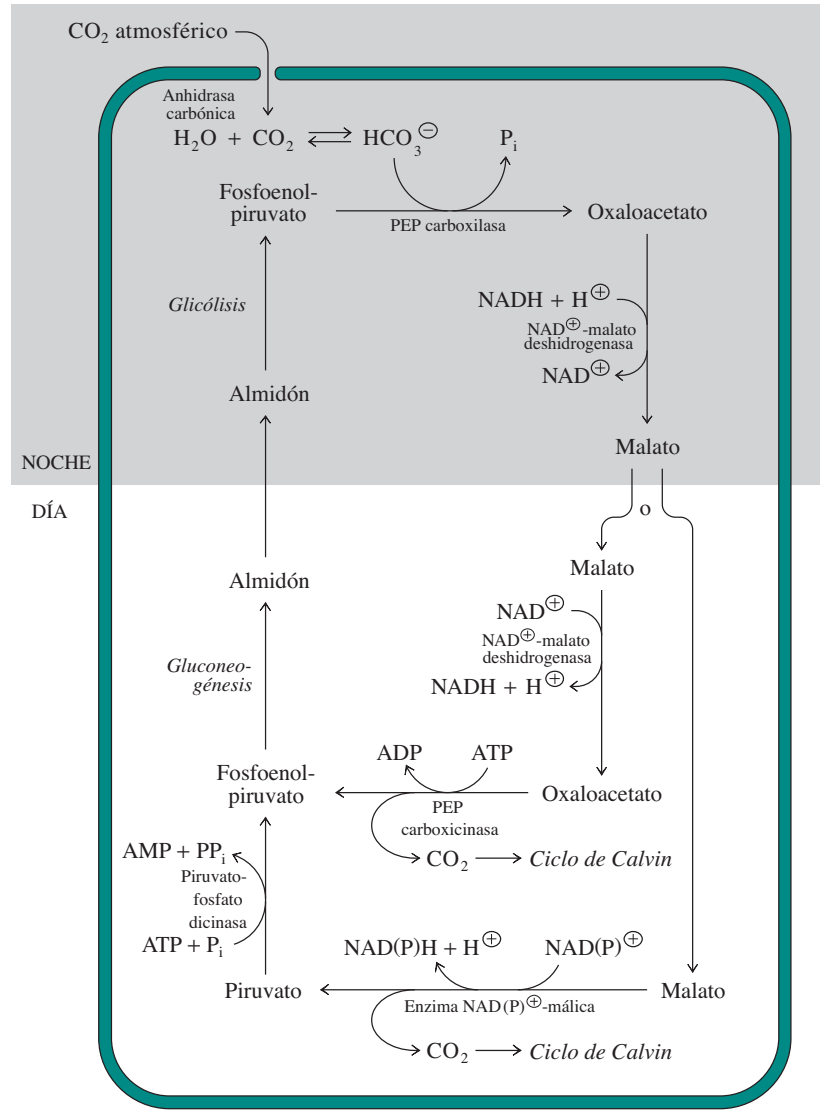


Figura 15.27 ▶
Metabolismo del ácido crasuláceo (CAM). En la noche, se absorbe CO_2 y la PEP carboxilasa y la $NAD^{\oplus}$-malato deshidrogenasa catalizan la formación de malato. El fosfoenolpiruvato necesario para la síntesis de malato se deriva del almidón. Al día siguiente, cuando se forman el NADPH y el ATP por las reacciones lumínicas, la descarboxilación del malato aumenta la concentración celular de CO_2, que puede fijarse por el ciclo de Calvin. La descarboxilación del malato sucede por cualquiera de dos rutas, dependiendo de la especie, y produce fosfoenolpiruvato, que a continuación se convierte en almidón por la gluconeogénesis.

Una propiedad reguladora importante de la ruta CAM es la inhibición de la PEP carboxilasa por malato y bajo pH. La PEP carboxilasa se inhibe en forma efectiva durante el día, cuando la concentración de malato citosólico es alta y el pH es bajo. Esta inhibición evita una circulación inútil de CO_2 y malato por la PEP carboxilasa, y evita la competencia entre la PEP carboxilasa y la Rubisco por el CO_2.

C. Fijación de carbono en las bacterias

Las bacterias evolucionaron con un mecanismo diferente, para asegurar que la Rubisco funcione en un ambiente rico en CO_2 y pobre en O_2. La Rubisco se concentra en microcompartimientos proteínicos, llamados carboxisomas (figura 15.13). Esos compartimientos contienen varias copias de la anhidrasa carbónica, que catalizan la deshidratación de $HCO_3^{\ominus}$ a CO_2. Así, el microambiente de los carboxisomas tiene una alta concentración de CO_2.

Resumen

1. La clorofila es el principal pigmento recolector de luz en la fotosíntesis. Cuando un par especial de moléculas de clorofila absorben un fotón de luz, un electrón pasa a un orbital molecular de mayor energía. Ese electrón puede ser transferido a una cadena de transporte de electrones, dando lugar a una molécula de clorofila deficiente en electrones.
2. Los pigmentos accesorios transfieren la energía al par especial de moléculas de clorofila, por transferencia de energía por resonancia.
3. Los complejos del fotosistema II (PSII) contienen un centro de reacción tipo II. Los electrones son transferidos desde el par especial de moléculas de clorofila a una cadena corta de transporte de electrones, formada por una clorofila, una feofitina, una quinona enlazada y una quinona móvil.
4. En algunas bacterias, las moléculas de QH_2 del PSII se unen al complejo del citocromo bc. Los electrones son transferidos al citocromo *c*, y este proceso se acopla con la transferencia de protones a través de la membrana, por medio del ciclo Q. Entonces, el citocromo *c* se une al PSII y regresa los electrones al par especial, deficiente en electrones, en un proceso cíclico de transferencia de electrones. El gradiente de protones que resulta impulsa la síntesis de ATP.
5. Los complejos del fotosistema I (PSI) contienen un centro de reacción tipo I. La cadena de transferencia de electrones está formada por dos clorofilas, una filoquinona, tres grupos de Fe-S y ferredoxina (o flavodoxina).
6. La ferredoxina reducida es el sustrato de la ferredoxina: $NADP^{\oplus}$ reductasa (FNR), y el NADPH es el producto de la fotosíntesis en el fotosistema I, en una transferencia no cíclica de electrones. En algunos casos, los electrones pasan de la ferredoxina al complejo del citocromo *bc*, y regresan al PSI por el citocromo *c*, en un proceso cíclico de transferencia de electrones.
7. Las cianobacterias y los cloroplastos contienen fotosistemas acoplados, formados por el PSI, el PSII y el citocromo *bf*, una versión fotosintética del citocromo *bc*. Cuando el PSII absorbe un fotón, se transfieren electrones de PSII al citocromo *bf* y a la plastocianina. La plastocianina reabastece los electrones al PSI. Cuando el PSI absorbe un fotón, se usan electrones excitados para sintetizar el NADPH. En los fotosistemas acoplados, el PSII se asocia a un complejo productor de oxígeno (OEC, *oxygen-evolving complex*) que cataliza la reducción de agua a O_2, y suministra electrones al par especial del PSII.
8. El esquema Z concibe al flujo de electrones durante la fotosíntesis en función del cambio en los potenciales de reducción de los diversos componentes de las cadenas de transferencia de electrones.
9. Los complejos de la fotosíntesis se concentran en las membranas tilacoidales de las cianobacterias. Los cloroplastos contienen un sistema complejo de membrana interna, formado por membranas tilacoidales.
10. El ciclo de Calvin es responsable de la fijación de CO_2 en los carbohidratos. La enzima clave es la ribulosa 1,5-*bi*fosfato carboxilasa-oxigenasa (Rubisco). La Rubisco es una enzima ineficiente, que cataliza la carboxilación de la ribulosa 1,5-*bi*fosfato. También cataliza una reacción de oxigenación.
11. Los productos principales de la síntesis fotosintética de carbohidratos en las plantas son la sacarosa y el almidón.
12. En algunas plantas, otras rutas de fijación del carbono sirven para aumentar la concentración de CO_2 en el sitio de las reacciones del ciclo de Calvin.

Problemas

1. El pez dragón de la Antártida es una especie de aguas profundas que hace destellar una luz roja bioluminiscente, para iluminar a su presa. Aunque normalmente los pigmentos visuales presentes en la retina del pez no son lo bastante sensibles para captar la luz roja, la del pez dragón contiene otros pigmentos derivados de la clorofila, que absorben a 667 nm. Sugiera cómo esos pigmentos de clorofila podrían actuar como fotosensibilizadores para ayudar al pez dragón a detectar presas, usando su propio faro de luz roja, que no pueden ver otros peces.

2. *a*) Se ha llamado "enzima que alimenta al mundo" a la ribulosa 1,5-*bi*fosfato carboxilasa oxigenasa (Rubisco). Explique con qué base se hace esta afirmación.

   b) También se ha dicho que la Rubisco es la enzima más incompetente del mundo, y la enzima más ineficiente en el metabolismo primario. Explique la base de esta afirmación.

3. La ecuación de la reducción fotosintética de CO_2 a carbohidrato (ecuación 15.1) también se puede escribir en la siguiente forma:

$$CO_2 + 2\,H_2O \xrightarrow{\text{Luz}} (CH_2O) + O_2 + H_2O$$

   Los átomos de oxígeno en el O_2 ¿se derivan de los de H_2O, de CO_2, o de los de ambos? ¿Cómo se podría demostrar experimentalmente esta afirmación?

4. *a*) Algunas bacterias fotosintéticas usan H_2S como donador de hidrógeno, y producen azufre elemental, en tanto que otras usan etanol y producen acetaldehído. Escriba las reacciones netas de la fotosíntesis (que correspondan a la ecuación 15.1) para estas bacterias.

   b) ¿Por qué esas bacterias no producen oxígeno

   c) Escriba una ecuación general de la fijación fotosintética de CO_2 en los carbohidratos, usando H_2A como donador de hidrógeno.

5. ¿Puede una suspensión de cloroplastos sintetizar en la oscuridad glucosa a partir de CO_2 y H_2O? Si no ¿qué debe agregarse a la glucosa para que haya síntesis? Suponga que están presentes todos los componentes del ciclo de Calvin.

6. *a*) ¿Cuántos fotones se absorben por cada molécula de O_2 producida en la fotosíntesis?

b) ¿Cuántos fotones deben ser absorbidos para generar el poder reductor del NADPH suficiente para sintetizar una molécula de triosa fosfato?

7. El 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea (DCMU) es un herbicida que bloquea el transporte de electrones de la fotosíntesis, del PSII al complejo del citocromo *bf*.

a) Cuando se agrega DCMU a cloroplastos aislados ¿cesarán la evolución de O_2 y la fotofosforilación?

b) Si se añade un aceptor externo de electrones que vuelva a oxidar el P680* ¿cómo afectará a la producción de O_2 y a la fotofosforilación?

8. *a*) El pH luminal de los cloroplastos suspendidos en una solución de pH 4.0 llega a 4.0 en pocos minutos. Explique por qué hay una explosión de síntesis de ATP cuando el pH de la solución externa se eleva con rapidez hasta 8.0 y se agregan el ADP y P_i.

b) Si hay presentes el ADP y P_i en exceso ¿por qué cesa la síntesis de ATP en pocos segundos?

9. El transporte cíclico de electrones se puede hacer al mismo tiempo que el no cíclico, bajo ciertas condiciones, en los cloroplastos. ¿Se producen ATP, O_2 o NADPH en el transporte cíclico de electrones?

10. Una planta se ha modificado genéticamente para contener un porcentaje de lípidos no saturados menor que el normal en las membranas tilacoidales de los cloroplastos. Esta planta genéticamente cambiada tiene mayor tolerancia a temperaturas más elevadas, y también muestra mejores velocidades de la fotosíntesis y de crecimiento a 40°C. ¿Qué componentes principales del sistema de fotosíntesis podrían afectarse al cambiar la composición lípidica de las membranas tilacoidales?

11. Se añadió un compuesto a cloroplastos aislados de espinaca, y se determinó el efecto sobre la fotofosforilación fotosintética, el consumo de protones y el transporte no cíclico de electrones. La adición del compuesto causó una inhibición de la fotofosforilación fotosintética (síntesis de ATP), una inhibición de consumo de protones y un aumento en el transporte no cíclico de electrones. Sugiera un mecanismo para este compuesto.

12. ¿Cuántas moléculas de ATP (o equivalentes de ATP) y del NADPH se requieren para sintetizar: *a*) una molécula de glucosa por fijación fotosintética de CO_2 en plantas, y *b*) incorporar un residuo de glucosa al almidón?

13. Después de una vuelta completa al ciclo de Calvin, ¿dónde aparecerán los átomos de carbono marcados en el $^{14}CO_2$, en: *a*) el gliceraldehído 3-fosfato, *b*) fructosa 6-fosfato y *c*) eritrosa 4-fosfato?

14. *a*) ¿Cuántos equivalentes más de ATP se requieren para sintetizar glucosa a partir de CO_2 en plantas con C_4, respecto al que se requiere en las plantas con C_3?

b) Explique por qué las plantas con C_4 fijan al CO_2 con una eficiencia mucho mayor que las plantas con C_3, a pesar del ATP adicional que se necesita.

15. Explique cómo alteran los siguientes cambios en las condiciones metabólicas al ciclo de Calvin: *a*) aumento del pH de estromas y *b*) disminución de la concentración de Mg^{2+} en estromas.

Lecturas seleccionadas

Generalidades

Finazzi, G., Rappaport, F. y Goldschmidt-Clermont, M. (2002). From light to life: an interdisciplinary journey into photosynthetic activity. EMBO Reports 4:752-756.

Fotosistemas

Baymann, F., Brugna, M., Mühlenhoff, U y Nitschke, W. (2001). Daddy, where did (PS)I come from? *Biochem. Biophys. Acta* 1507:5-310.

Fromme, P. (2001). Structure of photosystem I. *Biochem. Biophys. Acta* 1507:5-31.

Fromme, P., Melkozernov, A., Jordan, P. y Krauss, N. (2003). Structure and function of photosystem I: interaction with its soluble electron carriers and external antenna systems. *FEBS Lett.* 555:40-44.

Heathcote, P., Fyfe, P. K. y Jones, M. R. (2002). Reaction centres: the structure and evolution of biological solar power. *Trends Biochem. Sci.* 27:79-87.

Rhee, K.-H. (2001). Photosystem II: the solid structural era. *Ann. Rev. Biophys. Biomolec. Structure* 30:307-328.

Complejo de citocromo *bf*

Allen, J. F. (2004). Cytochrome b_6f: structure for signalling and vectorial metabolism. *Trends Plant Sci.* 9:130-137.

Cramer, W. A., Zhang, H., Yan, J., Kurisu, G. y Smith, J. L. (2004). Evolution of photosynthesis: time-independent structure of the cytochrome b_6f complex. *Biochem.* 43:5921-5929.

Ciclo de Calvin y metabolismo del almidón

Andrew, T. J. y Whitney, S. M. (2003). Manipulating ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase in the chloroplasts of higher plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 414:159-169.

Bhattacharyya, M. K., Smith, A. M., Ellis, T.H., Hendley, C. y Martin, C. (1990). The wrinkled-seed character of a pea described by Mendel is caused by a transposon-like insertion in a gene encoding starch-branching enzyme. Cell 60:115-122.

Hartmann, F.C. y Harpel, M. R. (1994). Structure, function, regulation and assembly of D-ribulose-1,5-*bis*phosphate carboxylase/ oxygenase. *Annu. Rev. Biochem.* 63:197-224.

Schnarrenberger, C. y Martin, W. (1997). The Calvin cycle–a historical perspective. *Photosynthetica* 33:331-345. Descripción de los avances desde la década de 1950.

16

capítulo dieciseis

Metabolismo de lípidos

La síntesis de lípidos es una parte esencial del metabolismo celular, porque los lípidos son componentes básicos de las membranas celulares. En este capítulo se describirán las rutas de los lípidos principales que se estudiaron en el capítulo 9. La ruta más importante es la síntesis de ácidos grasos, porque se requieren ácidos grasos para obtener triacilgliceroles. Otras rutas importantes de biosíntesis son la síntesis del colesterol, la de eicosanoides y la de esfingolípidos.

Los lípidos también pueden ser degradados como parte normal del metabolismo celular. La ruta catabólica más importante es la de oxidación de ácidos grasos (oxidación en la posición β). En esta ruta, los ácidos grasos de cadena larga se descomponen para formar acetil-CoA. Las rutas opuestas de biosíntesis y oxidación de ácidos grasos son otro ejemplo de la forma en que las células administran la producción y utilización de energía en forma compatible con los fundamentos de la termodinámica.

Las rutas catabólicas de metabolismo de lípidos son parte del metabolismo básico de combustibles en los animales. Los triacilgliceroles y el glucógeno son las dos formas principales de energía almacenada. El glucógeno puede abastecer de ATP a la contracción muscular sólo durante una fracción de una hora. El trabajo intenso sostenido, como la migración de las aves o el esfuerzo de los corredores de maratón, es respaldado por el metabolismo de los triacilgliceroles, que son sustancias anhidras, y sus ácidos grasos están más reducidos que los aminoácidos o los monosacáridos. Eso los hace almacenes muy eficientes de energía (sección 9.3). Los triacilgliceroles se oxidan cuando aumenta la demanda de energía, o cuando no se dispone de otras fuentes de energía, como la glucosa.

Se examinarán las rutas fundamentales del metabolismo de lípidos, las que existen en todas las especies vivientes. Cuando sea necesario se hará hincapié en las diferencias entre las rutas bacterianas y las eucarióticas. En la mayor parte de los casos esas diferencias son menores. Luego se describirá la absorción y utilización de los lípidos en la dieta de los mamíferos, incluyendo la regulación hormonal del metabolismo de lípidos.

Arriba: En tanto que el oso polar vive de su grasa almacenada gran parte del año, las aves migratorias usan sus reservas de grasa para volar.

16.1 Síntesis de ácidos grasos

Los ácidos grasos se sintetizan por adición repetitiva de unidades con dos carbonos al extremo en crecimiento de una cadena de hidrocarburo. Cuando se está alargando la cadena, está unida en forma covalente a la proteína coenzima ACP (*acyl carrier protein,* proteína portadora de acilo; sección 7.6) mediante un enlace tioéster. En la figura 16.1 se muestra una perspectiva de la síntesis de ácidos grasos.

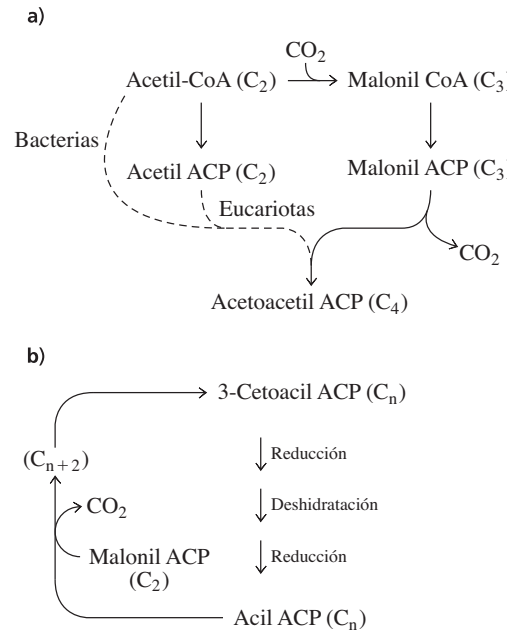
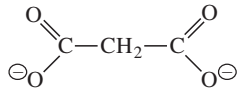


Figura 16.1 ▶
Esquema de la síntesis de los ácidos grasos. ***a***) Etapa de la iniciación. ***b***) Etapa del alargamiento.

Los primeros pasos en la ruta de la síntesis de ácidos grasos son la síntesis de acetil ACP y malonil ACP, a partir de la acetil-CoA. (Ácido malónico es el nombre del ácido dicarboxílico normal con C_3). El paso inicial en la ruta principal de síntesis de ácidos grasos consiste en una condensación de grupos acetilo y malonilo para formar un precursor con cuatro carbonos. En el paso de "elongación" (alargamiento), se modifica el producto de la condensación inicial mediante dos reacciones de reducción y una de deshidratación para formar acil ACP. La acil ACP sirve entonces como sustrato para más reacciones de condensación, usando malonil ACP como donador de dos carbonos.


Malonate

La síntesis de los ácidos grasos se efectúa en el citosol de todas las especies. En los mamíferos adultos se efectúa principalmente en las células hepáticas y los adipocitos. Algo de síntesis de ácidos grasos se efectúa en células especializadas, como en las glándulas mamarias durante la lactancia.

A. Síntesis de malonil ACP y acetil ACP

La malonil ACP es el sustrato principal de la biosíntesis de ácidos grasos. Se obtiene en dos pasos, y el primero es la carboxilación de la acetil-CoA en el citosol, para formar malonil-CoA (figura 16.2). La reacción de carboxilación es catalizada por la enzima

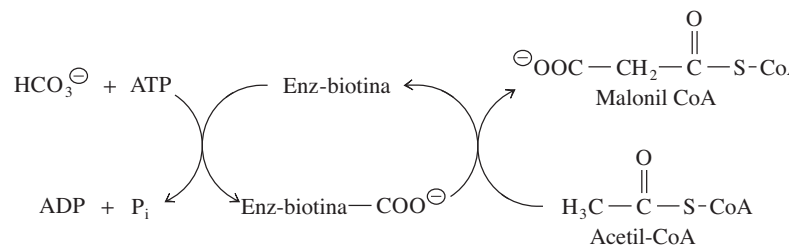
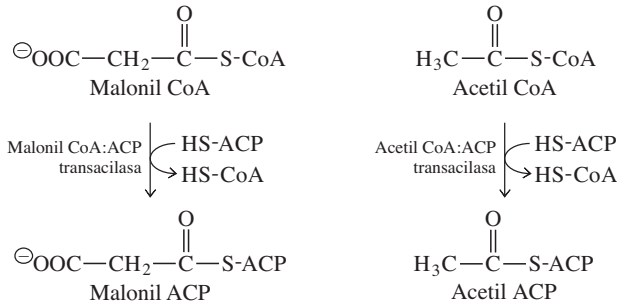


Figura 16.2 ▶
Carboxilación de la acetil-CoA para formar malonil CoA, catalizada por la acetil-CoA carboxilasa.



◀Figura 16.3
Síntesis del malonil ACP a partir de malonil CoA, y de acetil ACP a partir de la acetil-CoA.

acetil-CoA carboxilasa, dependiente de biotina, usando un mecanismo parecido a la reacción catalizada por la piruvato carboxilasa (figura 7.20). La activación del HCO_3^- dependiente de ATP forma carboxibiotina. A esta reacción sigue la transferencia de CO_2 activado a la acetil-CoA para formar malonil CoA. En los eucariotas, esas reacciones están catalizadas por una enzima bifuncional, y la biotina está en un brazo flexible que se mueve entre los dos sitios activos. La versión bacteriana de la acetil-CoA carboxilasa es un complejo enzimático de muchas subunidades, que contiene biotina carboxilasa, proteína portadora de biotina carboxilasa y una transcarboxilasa heterodimérica. La reacción de carboxilación es metabólicamente irreversible, y la acetil-CoA carboxilasa es la enzima clave reguladora de la síntesis de ácidos grasos.

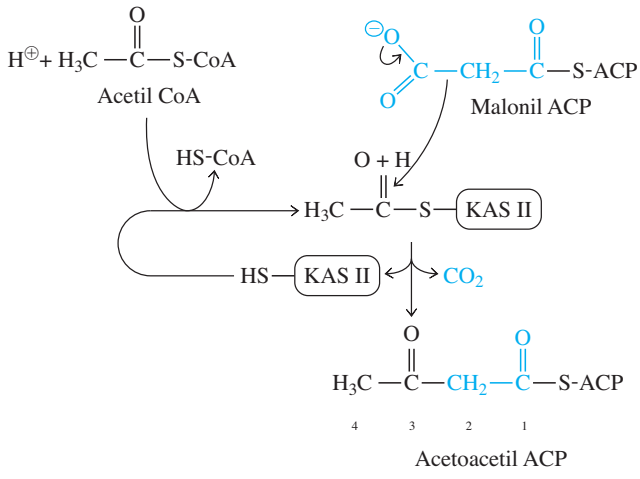
El segundo paso en la síntesis de la malonil ACP es la transferencia del malonilo y de la coenzima A a la ACP. Esta reacción es catalizada por la malonilCoA:ACP transacilasa (figura 16.3). Una enzima parecida, llamada Acetil-CoA:ACP transacilasa que convierte a la acetil-CoA en acetil ACP.

B. Reacción de iniciación en la síntesis de ácidos grasos

La síntesis de ácidos grasos de cadena larga comienza con la formación de una unidad con cuatro carbonos unida a la ACP. Esta molécula, llamada acetoacetil ACP, se forma por condensación de un sustrato con dos carbonos (acetil-CoA o acetil ACP) y un sustrato con tres carbonos (malonil ACP), con pérdida de CO_2. La reacción es catalizada por la 3-cetoacil ACP sintasa (KAS, *ketoacyl synthase*).

Hay varias versiones de KAS en las células bacterianas. Una forma de la enzima (KAS III) se usa en la reacción de iniciación, y otras formas (KAS I y KAS II) se utilizan en las reacciones de elongación que siguen. La KAS III bacteriana usa acetil-CoA para la reacción de condensación inicial con malonil ACP (figura 16.4).

En esta reacción, una unidad con dos carbonos de la acetil-CoA se transfiere a la enzima, donde se une en forma covalente mediante un enlace tioéster. Entonces, la enzima



◀Figura 16.4
Síntesis de la acetoacetil ACP en bacterias.

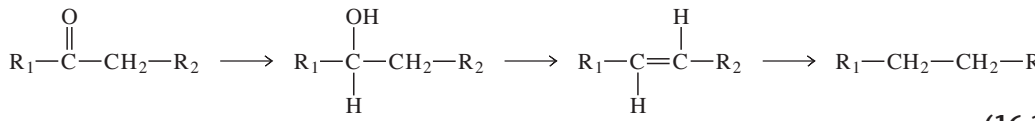
cataliza la transferencia de esta unidad con dos carbonos al extremo de la malonil ACP, formando un compuesto intermedio con cuatro carbonos y liberando CO_2. Las versiones eucarióticas de la ACP sintasa efectúan la misma reacción, pero usan acetil ACP como sustrato inicial, en vez de acetil-CoA.

Recuérdese que en la síntesis del malonil-CoA interviene la carboxilación de la acetil-CoA (figura 16.3), dependiente de ATP. Esta estrategia de carboxilar primero y después descaboxilar un compuesto, que se usa en una reacción de síntesis, da como resultado un cambio favorable de energía libre para el proceso, a expensas de un consumo de ATP en el paso de carboxilación. En la gluconeogénesis en los mamíferos se observa una estrategia parecida, donde primero se carboxila piruvato (C_3) para formar oxaloacetato (C_4), para después descarboxilar el oxaloacetato para formar la molécula de fosfoenolpiruvato con C_3 (sección 12.1).

C. Reacciones de elongación en la síntesis de ácidos grasos

La acetoacetil ACP contiene la mitad de 3-cetoacil. El "3-ceto" en el nombre de esta molécula se refiere a la presencia de un grupo ceto en la posición del C-3. En la terminología anterior, este átomo de carbono era el carbono-β y al producto se le llamaba mitad de β-cetoacil. También a la enzima de condensación se le llama β-cetoacil ACP sintasa.

Para preparar las reacciones de condensación posteriores, esta mitad oxidada de 3-cetoacil debe reducirse hasta una forma acilo por transferencia de electrones (y protones) a la posición del carbono 3. Se requieren tres reacciones separadas.



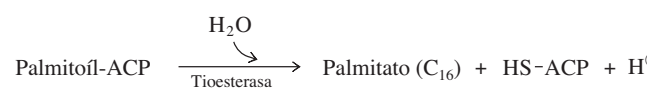
(16.1)

En la primera reducción, la cetona se convierte en un alcohol. El segundo paso es la eliminación de agua por una deshidratasa, para formar un doble enlace C═C. Por último, una segunda reducción adiciona hidrógenos, para formar el grupo acilo totalmente reducido. Es una estrategia de óxido-reducción frecuente en las rutas bioquímicas. Se ha visto un ejemplo de las reacciones inversas en el ciclo del ácido cítrico, donde el succinato se convierte en oxaloacetato pasando por fumarato y malato (figura 13.3).

Las reacciones específicas del ciclo de elongación se observan en la figura 16.5. Nótese que durante la síntesis se forma el isómero D del compuesto intermedio con 3-hidroxi, en una reacción dependiente de NADPH. En la sección 16.7 se verá que el isómero L se forma durante la degradación de los ácidos grasos.

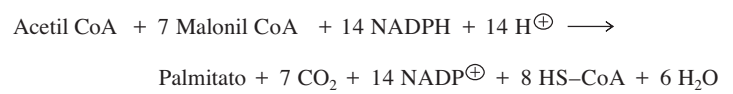
El producto final de los pasos de reducción, deshidratación y reducción es una acil ACP, dos carbonos más larga. Esta acil ACP se convierte en el sustrato para las formas de elongación de la 3-cetoacil ACP sintasa (KAS I y KAS II). Todas las especies usan la malonil ACP como donador de carbonos en la reacción de condensación. Las reacciones de elongación se repiten muchas veces, y forman cadenas de ácido graso cada vez más largas.

El producto final de la síntesis de ácidos grasos tiene 16 y 18 carbonos. Las cadenas más largas no pueden caber en el sitio de enlace de la enzima de condensación. El ácido graso terminado es liberado de la ACP por acción de una tioesterasa, que cataliza una reacción de ruptura donde se regenera la HS-ACP. Por ejemplo, La palmitoíl ACP es un sustrato para una tioesterasa que cataliza la formación de palmitato y HS-ACP.

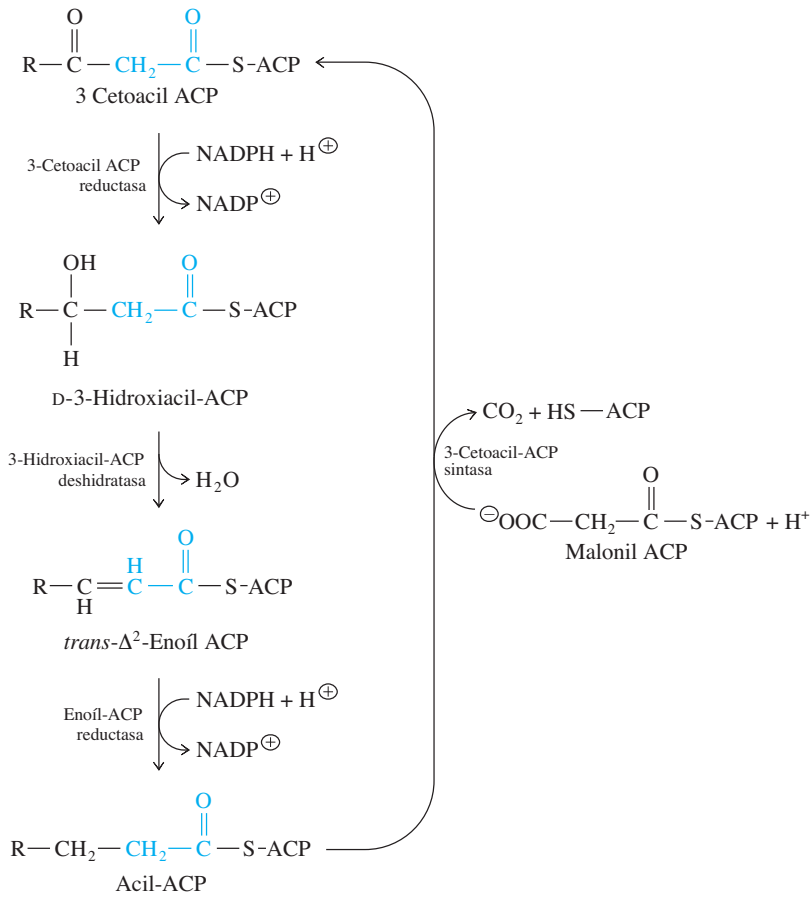


(16.2)

La estequiometría total de la síntesis del palmitato a partir de acetil-CoA y malonil CoA es



(16.3)



◀Figura 16.5
Etapa de alargamiento en la síntesis de los ácidos grasos. R representa $—CH_3$ en acetoacetil ACP, o $[—CH_2—CH_2]_n—CH_3$ en otras moléculas de 3-cetoacil ACP.

En las bacterias, cada reacción de la síntesis de ácidos grasos es catalizada por una enzima discreta y monofuncional. Este tipo de ruta se llama sistema de síntesis de ácidos grasos tipo II (FAS II, de *fatty-acid synthesis II*). En los animales, las diversas actividades enzimáticas se localizan en dominios individuales dentro de una enzima multifuncional grande, y al complejo se le llama sistema de síntesis de ácidos grasos tipo I (FAS I). El gran polipéptido animal contiene las actividades de la malonil/acetil transferasa, la 3-cetoacil sintasa, la 3-cetoacil ACP reductasa, la 3-hidroxiacil ACP deshidratasa, la enoíl ACP reductasa y la tioesterasa. También contiene un grupo prostético de fosfopanteteína (ACP), al que está unida la cadena de ácido graso. Nótese que la malonil-CoA:ACP transacilasa que se ve en la figura 16.3 se sustituye por una actividad de transferasa en el complejo FAS I. Esta transferasa cataliza una reacción de carga de sustrato, donde el malonil-CoA está unido en forma covalente al dominio semejante a ACP en la cadena polipeptídica de la multienzima. La enzima eucariótica se llama ácido graso sintasa.

D. Activación de los ácidos grasos

La reacción de tioesterasa (ecuación 16.2) da como resultado la liberación de ácidos grasos, pero las modificaciones siguientes de esos ácidos grasos, y su incorporación a los lípidos de membrana, requieren un paso de activación, donde se convierten en tioésteres de la coenzima A en una reacción dependiente de ATP y catalizada por la acil-CoA sintetasa (figura 16.6). El pirofosfato liberado en esta reacción se hidroliza en dos moléculas de fosfato, por acción de la pirofosfatasa. El resultado es que se consumen dos enlaces de fosfoanhídrido, o dos equivalentes de ATP, para formar los tioésteres de CoA y ácidos grasos. En general, las bacterias tienen una sola acil-CoA sintetasa, pero en los mamíferos hay al menos cuatro isoformas diferentes de acil-CoA sintetasa. Cada

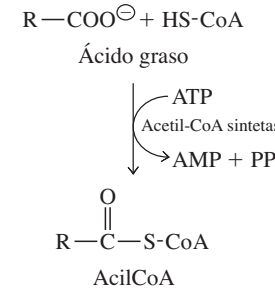


Figura 16.6 ▲
Activación de los ácidos grasos.

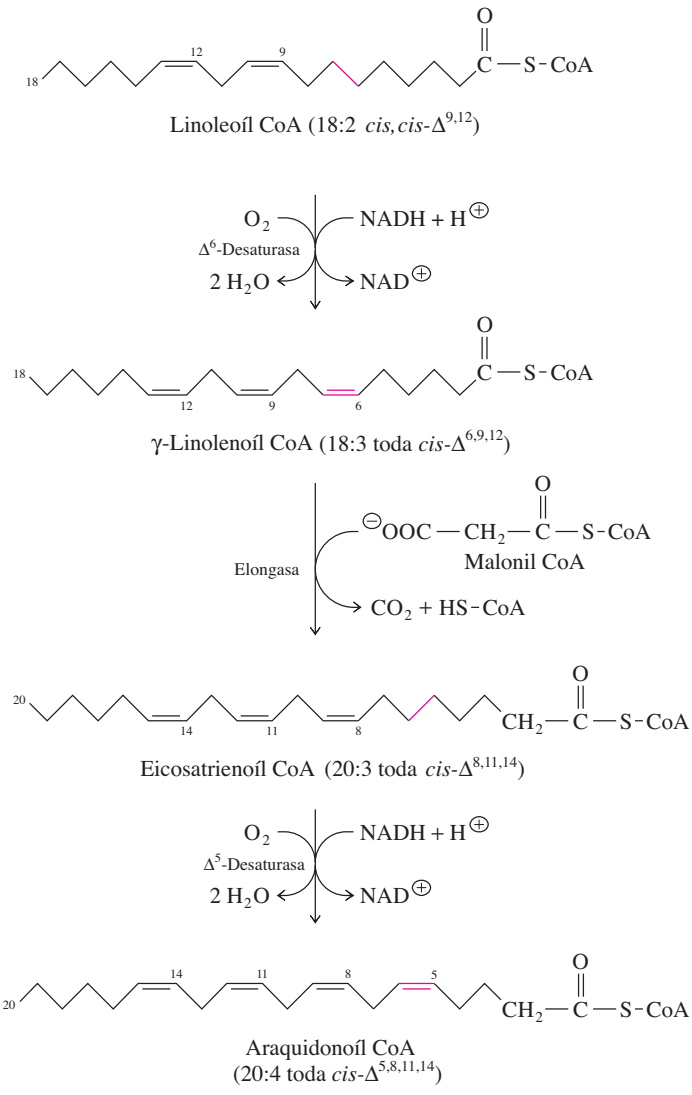
una de las distintas enzimas es específica para determinada longitud de cadena de ácidos grasos: corta ($<C_6$), mediana (de C_6 a C_{12}), larga ($>C_{12}$) o muy larga ($>C_{16}$). El mecanismo de la reacción de activación es igual que el de la síntesis de la acetil-CoA a partir de acetato y CoA (figura 10.13).

E. Extensiones y desaturación de ácidos grasos

La ruta de la ácido graso sintasa no puede fabricar ácidos grasos más largos que 16 o 18 carbonos (C_{16} o C_{18}). Los ácidos grasos más largos se obtienen extendiendo el palmitoíl-CoA o el estearoíl-CoA. Las enzimas que catalizan esas extensiones se llaman elongasas, y usan el malonil-CoA (no malonil ACP) como fuente de la unidad de extensión con dos carbonos. En la figura 16.7, abajo, se ve un ejemplo de una reacción con elongasa en el paso 2. Los ácidos grasos de cadena larga, con C_{20} y C_{22}, son comunes, pero los ácidos grasos con C_{24} y C_{26} son raros.

Los ácidos grasos no saturados se sintetizan tanto en las bacterias como en los eucariotas, pero las rutas son bastante diferentes. En los sistemas de ácidos grasos tipo II (bacterias) se adiciona un doble enlace a la cadena creciente, cuando su longitud llega a 10 átomos de carbono. Unas enzimas específicas que reconocen al intermedio con C_{10} catalizan la reacción. Por ejemplo, la 3-hidroxidecanoíl-ACP deshidratasa introduce en forma específica un doble enlace en la posición 2, justo como en la reacción normal de

Figura 16.7 ▶
Reacciones de elongación y desaturación en la conversión de linoleoíl CoA en araquidonoíl CoA.



la deshidratasa durante la síntesis de ácidos grasos (figura 16.5). Sin embargo, la C_{10} deshidratasa específica crea una *cis*-2-decanoíl ACP, y no la configuración trans, que sirve como sustrato para la enoíl ACP reductasa.

El alargamiento posterior de este ácido graso no saturado prosigue por la ruta normal de la ácido graso sintasa, excepto que una 3-cetoacil ACP sintasa específica reconoce al ácido graso no saturado en la reacción de condensación. Los productos finales serán ácidos grasos no saturados 16:1 Δ^8 y 18:1 Δ^{10}. Esos productos pueden modificarse después, para formar ácidos grasos poliinsaturados (AGPI o PUFA, de *polyunsaturated fatty acid*) en las bacterias. Las cadenas pueden extenderse con enzimas elongasas, y se introducen dobles enlaces adicionales mediante una clase de enzimas llamadas desaturasas. Las bacterias contienen una gigantesca variedad de AGPI que sirven para aumentar la fluidez de las membranas, cuando las especies se encuentran con bajas temperaturas (sección 9.9). Por ejemplo, muchas especies de bacterias marinas sintetizan AGPI con 20:5 y 22:6. El 25% de los ácidos grasos en la membrana son largos y poliinsaturados en esas especies.

La nomenclatura de los ácidos grasos no saturados se describió en la sección 9.2.

La introducción de un doble enlace durante la síntesis de los ácidos grasos no es posible en los eucariotas, porque usan la ácido graso sintasa tipo I. Esta enzima ácido graso sintasa contiene una sola actividad de 3-cetoacilo ACP sintasa (KAS) que es parte de una proteína multifuncional grande. El sitio activo de la KAS eucariótica no reconoce intermedios de ácidos grasos no saturados, y no los podría extender si fueran creados en el paso de C_{10}, como en las bacterias. En consecuencia, los eucariotas sintetizan ácidos grasos no saturados sólo usando desaturasas que actúan sobre los derivados de ácido graso completados, palmitoíl-CoA y estearoíl-CoA.

La mayor parte de las células eucarióticas contienen varias desaturasas que catalizan la formación de dobles enlaces, a partir de quince carbonos de distancia del extremo carboxilo en los ácidos grasos. Por ejemplo, el palmitoíl-CoA se oxida y forma su análogo 16:1 Δ^9, que se puede hidrolizar para formar el palmitoleato, un ácido graso común. Los ácidos grasos poliinsaturados se sintetizan por la acción secuencial de distintas desaturasas, muy específicas. En la mayor parte de los casos, los dobles enlaces están distantes a intervalos de tres carbonos, como en la síntesis del α-linoleato en las plantas.

$$18:0\ (\text{stearoíl CoA}) \longrightarrow 18:1\ \Delta^9 \longrightarrow 18:2\ \Delta^{9,12}\ (\text{linolenoíl CoA}) \longrightarrow$$

$$18:3\ \Delta^{9,12,15}\ (\alpha\text{-linolenoíl CoA}) \qquad \textbf{(16.4)}$$

Las células en los mamíferos no contienen una desaturasa que actúe más allá de la posición del C-9, y no pueden sintetizar el linoleato ni el α-linoleato. Sin embargo, los AGPI con dobles enlaces en la posición 12 son absolutamente esenciales para la supervivencia, porque son precursores para la síntesis de los eicosanoides importantes, como las prostaglandinas. Como no tienen una Δ^{12} desaturasa, los mamíferos deben obtener el linoleato en su dieta. Es un ácido graso esencial en la dieta humana. Son raras las deficiencias del α-linoleato, porque la mayor parte de los alimentos contienen cantidades adecuadas. Por ejemplo, las plantas son ricas fuentes de AGPI. Sin embargo, la composición de muchos suplementos "vitamínicos" incluye al ácido linoleico.

Además de los ácidos grasos esenciales, las dietas de los mamíferos deben contener varias vitaminas esenciales (capítulo 7) y varios aminoácidos esenciales (capítulo 17).

Los mamíferos pueden convertir el linoleato de su dieta (activado a linoleoíl CoA) en araquidonoíl CoA (20:4) con una serie de reacciones de desaturación y alargamiento (figura 16.7). (El araquidonato derivado de los fosfolípidos es precursor de los eicosanoides, sección 16.3.) Esta ruta ilustra ejemplos típicos de actividad de elongasa y desaturasa en la síntesis de los complejos de AGPI. El compuesto intermedio, γ-linolenoíl CoA (18:3) en la ruta del araquidonato puede tener elongación y desaturación para producir ácidos grasos poliinsaturados con C_{20} y C_{22}. Nótese que los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados no son conjugados, sino que un grupo metileno interrumpe la conjugación. Así, por ejemplo, un doble enlace Δ^9 dirige la inserción del doble enlace siguiente en la posición Δ^6 o en la posición Δ^{12}.

16.2 Síntesis de triacilgliceroles y de glicerofosfolípidos

La mayor parte de los ácidos grasos están en forma esterificada como triacilgliceroles (triglicéridos) o como glicerofosfolípidos (secciones 9.3 y 9.4). El fosfatidato es un interme-

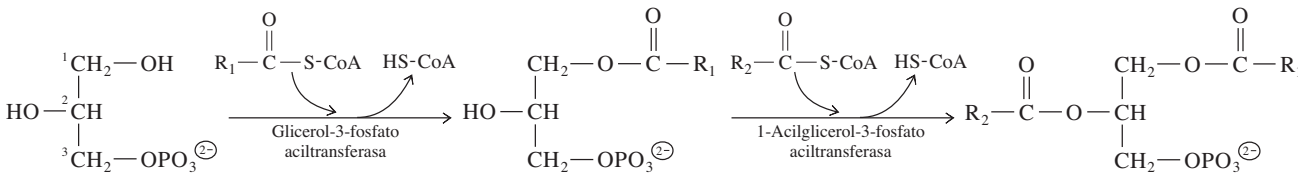


Figura 16.8 ▲
Formación del fosfatidato. La glicerol-3-fosfato aciltransferasa cataliza la esterificación del glicerol 3-fosfato en el C-1. Tiene preferencia por las cadenas saturadas de acilo. La 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa cataliza la esterificación en el C-2, y tiene preferencia por cadenas de acilo no saturadas.

dio en la síntesis de los triacilgliceroles y de los glicerofosfolípidos. Se forma al transferir los grupos acilo a partir de moléculas de acil-CoA graso a las posiciones de los C-1 y C-2 del glicerol 3-fosfato (figura 16.8). Las reacciones son catalizadas por dos aciltransferasas separadas que usan moléculas de acil-CoA como donadores de grupo acilo. La primera aciltransferasa (glicerol-3-fosfato aciltransferasa), que tiene preferencia por cadenas saturadas de acilo graso, cataliza la esterificación en el C-1 del glicerol 3-fosfato, para formar 1-acilglicerol 3-fosfato (lisofosfatidato). La segunda aciltransferasa (1-acilglicerol-3-fos-

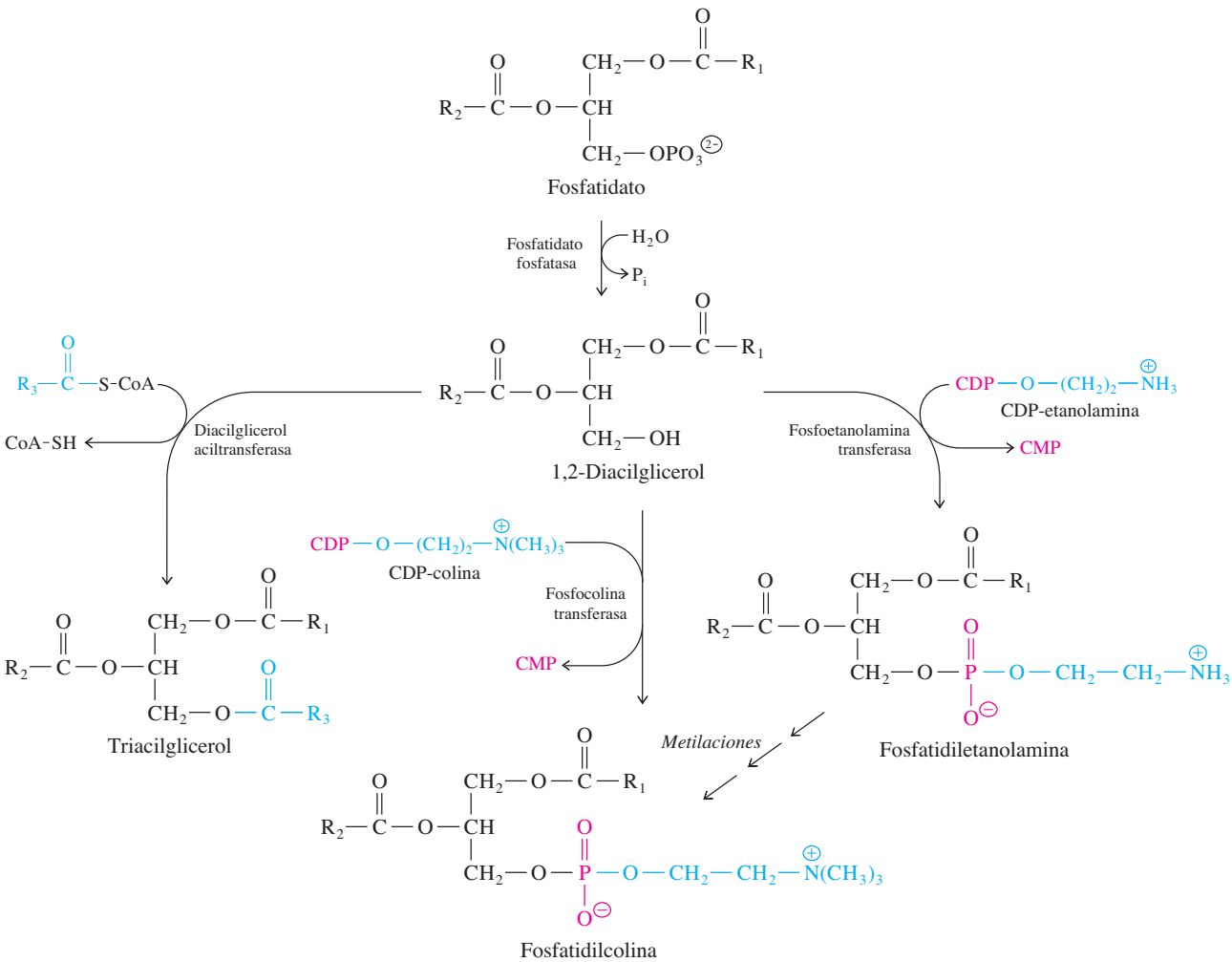


Figura 16.9 ▲
Síntesis de los triacilgliceroles y de los fosfolípidos neutros. La formación de los triacilgliceroles, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina se efectúa a través de un diacilglicerol intermedio. Un derivado de un nucleótido de citosina cede los grupos de cabeza polares de los fosfolípidos. Tres reacciones enzimáticas de metilación, en las que la S-adenosilmetionina es el donador de grupo metilo, convierten a la fosfatidiletanolamina en fosfatidilcolina.

fato aciltransferasa) que prefiere cadenas no saturadas, cataliza la esterificación en el C-2 del 1-acilglicerol 3-fosfato. El producto es un fosfatidato, uno de una familia de moléculas cuyas propiedades específicas dependen de los grupos acilo unidos a ellas.

La formación de los triacilgliceroles y de los fosfolípidos neutros, a partir del fosfatidato, comienza con la desfosforilación, catalizada por la fosfatidato fosfatasa (figura 16.9). El producto de esta reacción, es un 1,2-diacilglicerol, puede acilarse directamente para formar un triacilglicerol. Alternativamente, el 1,2-diacilglicerol puede reaccionar con un derivado de nucleótido-alcohol, como CDP-colina o CDP-etanolamina (sección 7.3) para formar la fosfatidilcolina o la fosfatidiletanolamina, respectivamente. Estos derivados se forman a partir del CTP con la reacción general

$$\text{CTP} + \text{Alcohol fosfato} \longrightarrow \text{CDP–alcohol} + \text{PP}_i \qquad \textbf{(16.5)}$$

También se puede sintetizar la fosfatidilcolina por metilación de la fosfatidiletanolamina mediante la *S*-adenosilmetionina (sección 7.3).

El fosfatidato también es precursor de los fosfolípidos ácidos. En esta ruta primero se activa el fosfatidato reaccionando con el CTP, para formar el CDP-diacilglicerol, li-

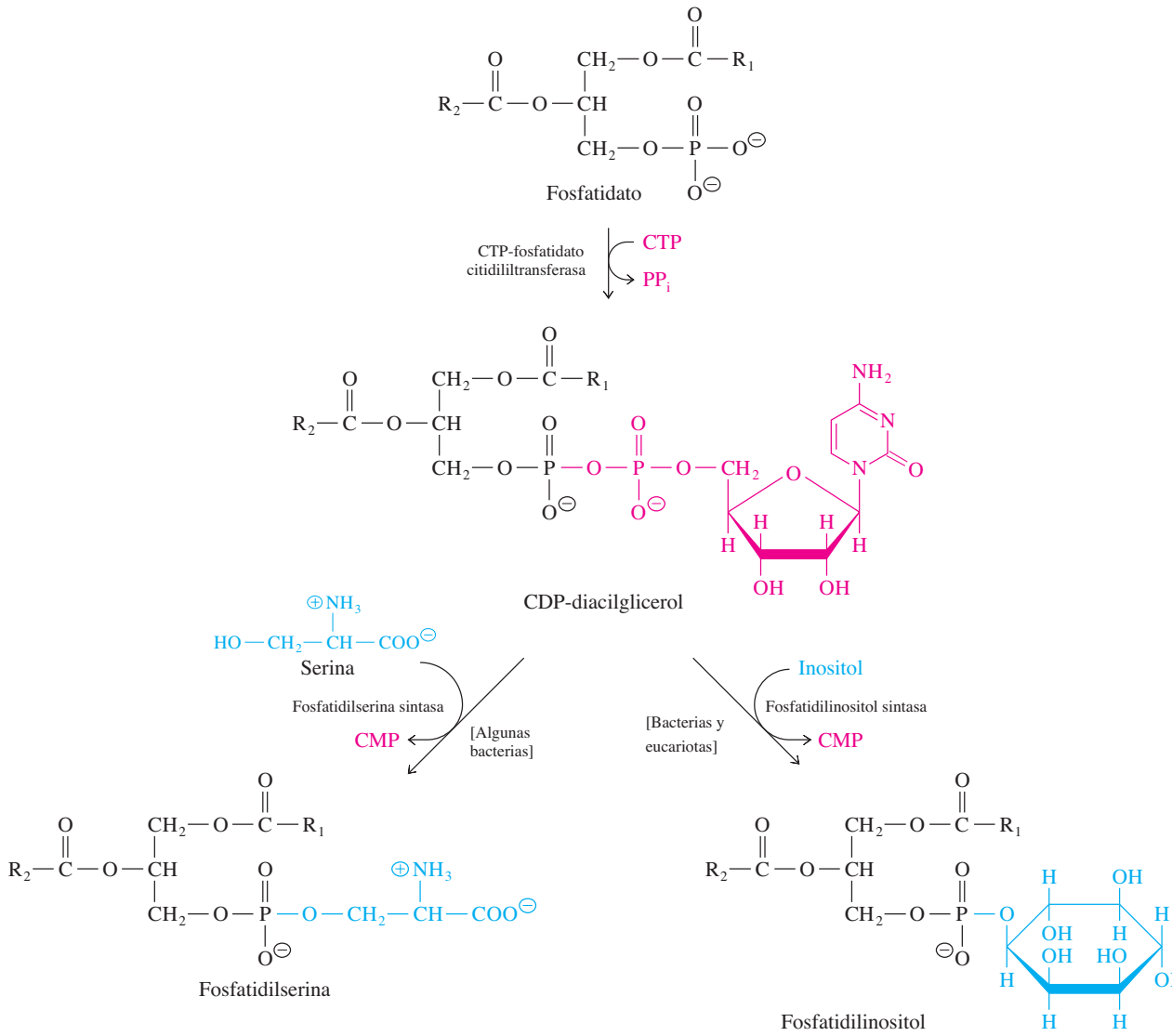
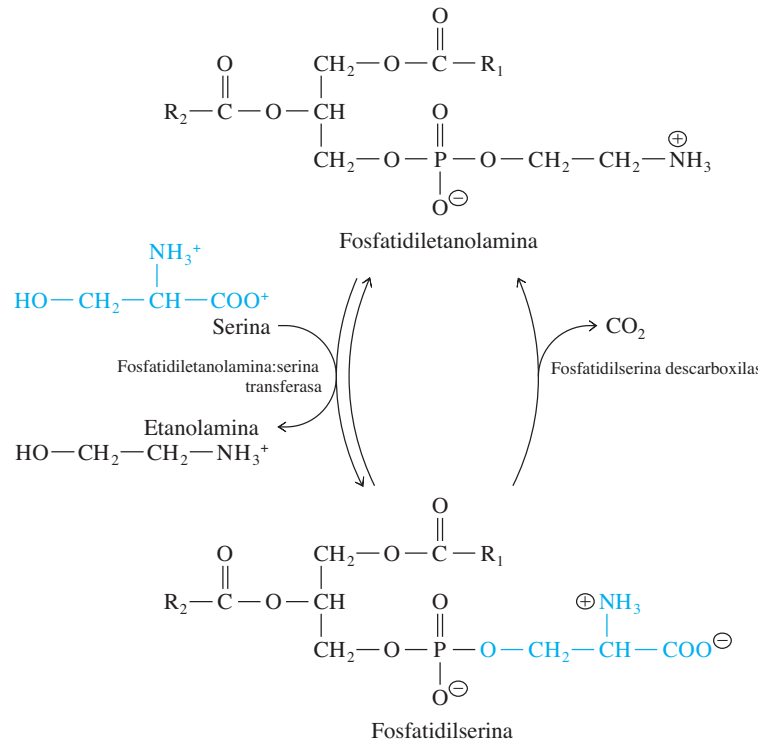


Figura 16.10 ▲
Síntesis de los fosfolípidos ácidos. El fosfatidato acepta un grupo citidililo del CTP para formar CDP-diacilglicerol. A continuación el CMP es desplazado por un grupo alcohol de la serina o del inositol, para formar fosfatidilserina o fosfatidilinositol, respectivamente.

berando pirofosfato (figura 16.10). En algunas bacterias, el desplazamiento del CMP por serina produce la fosfatidilserina. Tanto en los procariotas como en los eucariotas, el desplazamiento del CMP por inositol produce el fosfatidilinositol. El fosfatidilinositol se puede convertir en fosfatidilinositol 4-fosfato (PIP) y fosfatidilinositol 4,5-*bi*fosfato, PIP_2, mediante reacciones sucesivas de fosforilación, dependientes de ATP. Recuérdese que el PIP_2 es el precursor de los segundos mensajeros, el inositol 1,4,5-*tri*fosfato (IP_3) y el diacilglicerol (figura 9.44).

La mayor parte de los eucariotas usan una ruta diferente para la síntesis de la fosfatidilserina. Se forma a partir de la fosfatidiletanolamina a través del desplazamiento reversible de la etanolamina por serina, catalizada por la fosfatidiletanola mina:serina transferasa (figura 16.11). La fosfatidilserina se puede regresar a fosfatidiletanolamina en una reacción de descarboxilación catalizada por la fosfatidilserina descarboxilasa.

Figura 16.11 ▶
Interconversiones de fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina.



16.3 Síntesis de eicosanoides

Hay dos clases generales de eicosanoides: prostaglandinas + tromboxanos, y leucotrienos. El araquidonato (20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$) es el precursor de muchos eicosanoides. Recuérdese que el araquidonato se sintetiza a partir del linoleoíl CoA (18:2 $\Delta^{9,12}$) en una ruta que requiere una Δ^6 desaturasa, una elongasa y una Δ^5 desaturasa, como se ve en la figura 16.7.

Las prostaglandinas se sintetizan por ciclación del araquidonato en una reacción catalizada por una enzima bifuncional llamada prostaglandina H sintasa (PGHS). La enzima está unida en la superficie interna del retículo endoplásmico. La actividad de ciclooxigenasa (COX) de la enzima cataliza la formación de un hidroperóxido (prostaglandina G_2). La enzima PGHS contiene un segundo sitio activo para la actividad de hidroperoxidasa, que convierte rápidamente al hidroperóxido inestable en prostaglandina H_2 (figura 16.12). Este producto es convertido en diversas moléculas reguladoras de vida corta, incluyendo prostaciclina, prostaglandinas y tromboxano A_2. A diferencia de las hormonas, producidas en las glándulas, que viajan en la sangre hasta sus sitios de acción, en forma típica los eicosanoides actúan en la cercanía inmediata de la célula

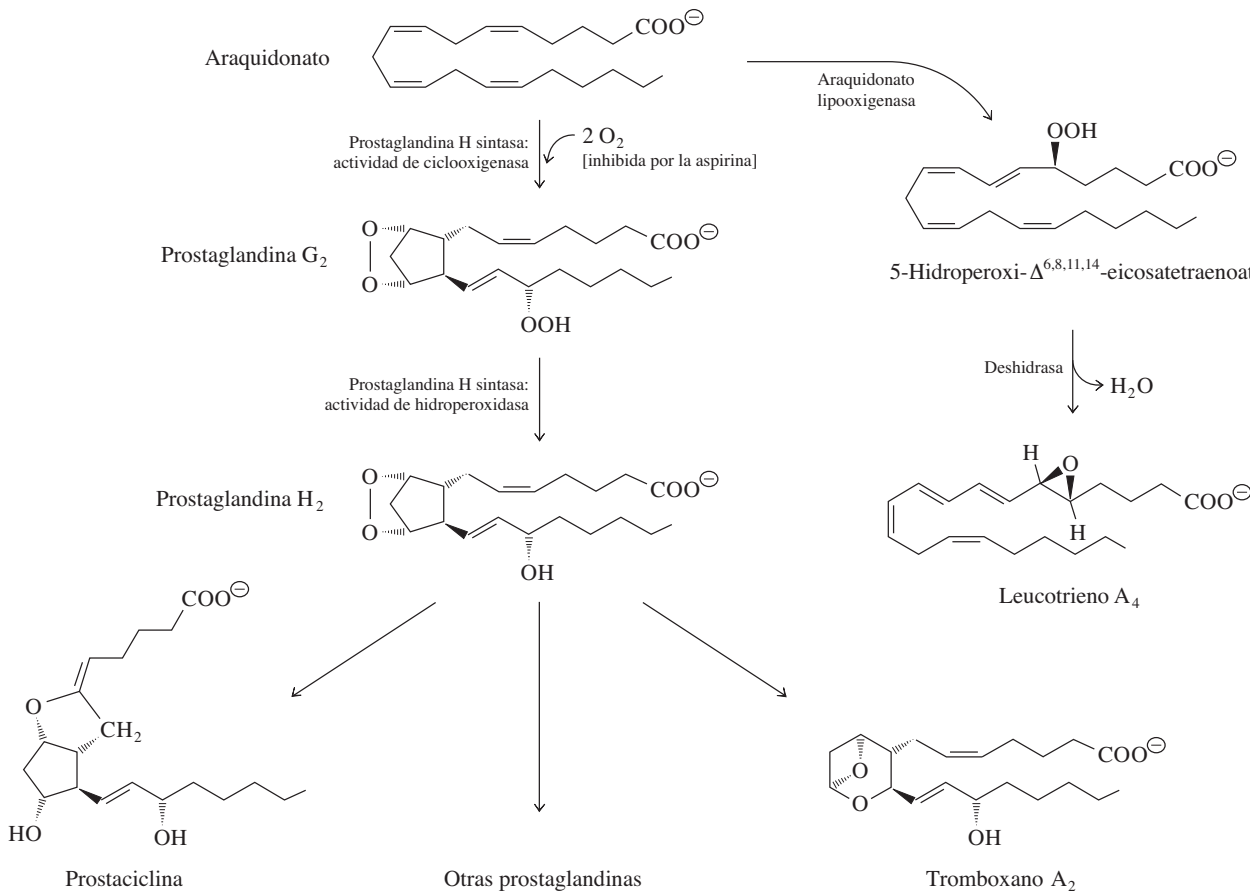


Figura 16.12 ▲
Principales rutas para la formación de los eicosanoides. La ruta de la prostaglandina H sintasa (PGHS) conduce a la prostaglandina H_2, que se puede convertir en prostaciclina, tromboxano A_2 y diversas prostaglandinas. La ruta de la lipooxigenasa produce leucotrieno A_4, precursor de algunos otros leucotrienos. La actividad de ciclooxigenasa de la PGHS se inhibe con aspirina.

donde se producen. Por ejemplo, el tromboxano A_2, producido por las plaquetas en la sangre, causa agregación de plaquetas y coágulos sanguíneos, así como constricción de los músculos lisos de las paredes arteriales, y da lugar a cambios localizados en el flujo sanguíneo. El útero produce prostaglandinas que disparan contracciones durante el parto. Los eicosanoides también son intermediarios en la sensibilidad al dolor, inflamaciones e hinchazones.

Recuerde que debe suministrarse el linoleato en la dieta, en general de las plantas, para sostener la síntesis del araquidonato y de los eicosanoides. Una de las razones por las que el linoleato es *esencial* es porque se requiere para la síntesis de las prostaglandinas, y las prostaglandinas son necesarias para la supervivencia.

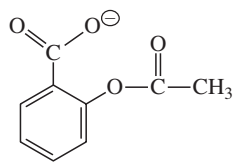
La aspirina bloquea la producción de algunos eicosanoides, y en consecuencia alivia los síntomas del dolor y reduce la fiebre. El ingrediente activo de la aspirina es el ácido acetilsalicílico, que inhibe la actividad de la COX en forma irreversible al transferir un grupo acetilo a un residuo de serina en el sitio activo de la enzima bifuncional. Al bloquear la actividad de la COX (ciclooxigenasa), la aspirina evita la formación de diversos eicosanoides que son sintetizados después de la reacción de la COX. La aspirina se desarrolló como medicamento para el comercio en 1897, pero desde hacía mucho tiempo se usaban otros salicilatos para combatir el dolor. Por ejemplo, los griegos antiguos usaban la corteza de árboles de sauce para aliviar el dolor. La corteza de sauce es una fuente natural de salicilatos.

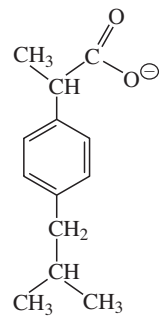
RECUADRO 16.1 Búsqueda de un sustituto de la aspirina

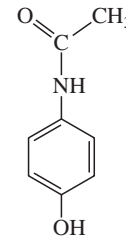
La mayor parte de los salicilatos naturales tienen efectos secundarios notables. Causan inflamación de la boca, garganta y estómago, y saben horrible. La aspirina evita la mayor parte de esos efectos secundarios y por ello se convirtió en un medicamento tan popular desde que fue introducido. Sin embargo, la aspirina puede causar mareos, zumbido de oídos y hemorragias o úlceras del recubrimiento estomacal. Hay dos formas distintas de PGHS (también llamadas COX por su actividad de ciclooxigenasa). La COX-1 es una enzima de constitución que regula la secreción de mucina en el estómago, y por consiguiente protege la pared gástrica. La COX-2 es una enzima inducible que promueve inflamación, dolor y fiebre. La aspirina inhibe ambas isozimas.

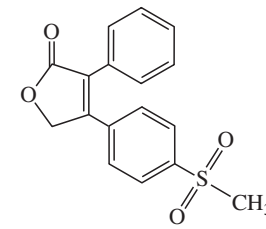
Hay muchos otros medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID, *nonsteroidal anti-inflammatory drugs*) que inhiben la actividad de la COX. La aspirina es la única que la inhibe por modificación covalente de la enzima. Las demás actúan compitiendo con el araquidonato para unirse al sitio activo de la COX. El ibuprofén (Advil®), por ejemplo, se enlaza rápido pero débilmente al sitio activo, y la inhibición se invierte con facilidad cuando bajan las concentraciones del medicamento. El acetaminofén (Tylenol®) es un inhibidor efectivo de la actividad de la COX en células intactas.

A los médicos les gustaría contar con un medicamento que inhibiera en forma selectiva a la COX-2 y no a la COX-1. Ese compuesto no causaría irritación estomacal. Se han sintetizado varios inhibidores específicos de la COX-2, y en la actualidad hay muchos disponibles para los pacientes. Estas sustancias, si bien son costosas, son importantes para sujetos con artritis que deben tomar analgésicos en forma regular. En algunos casos, los nuevos medicamentos se han asociado a mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares, y han sido retirados del mercado. Los estudios cristalográficos con rayos X de la COX-2 y su interacción con esos inhibidores han ayudado en la investigación para obtener sustitutos aún mejores de la aspirina, sin los efectos secundarios cardiovasculares.


Aspirina


Ibuprofeno


Acetaminofén


Rofecoxib (Vioxx®), medicamento antiinflama no esteroideo específico de COX-2

La segunda clase de eicosanoides es la de los productos de reacciones catalizadas por las lipooxigenasas. En la figura 16.12 se muestra que la araquidonato lipooxigenasa cataliza el primer paso de la ruta que lleva al leucotrieno A_4. (El término *trieno* indica la presencia de tres dobles enlaces conjugados.) Otras reacciones posteriores producen otros leucotrienos, como los compuestos que antes se llamaban "sustancias de anafilaxia de reacción lenta" (respuesta alérgica), causantes de los efectos secundarios, a veces fatales, de los golpes de inmunización.

16.4 Síntesis de éter lipídicos

Los éter lipídicos tienen un enlace de éter en vez de uno de los normales de éster (sección 9.4). La ruta de la formación de los éter lipídicos comienza con la dihidroxiacetona fosfato (figura 16.13). Primero, un grupo acilo del acil-CoA graso se esterifica en el átomo de oxígeno del C-1 en la dihidroxiacetona fosfato, y se produce 1-acildihidroxiacetona fosfato. A continuación, un alcohol graso desplaza al ácido graso y produce 1-alquildihidroxiacetona fosfato. El grupo ceto de este compuesto se reduce entonces, con NADPH, para formar 1-alquilglicero-3-fosfato. A esta reducción sigue la esterificación del residuo del glicerol en el C-2, para producir 1-alquil-2-acilglicero-3-fosfato. Las reacciones que siguen, desfosforilación y adición de un grupo de cabeza polar (sea colina o etanolamina) son las mismas que las mostradas antes en la figura 16.9. Los

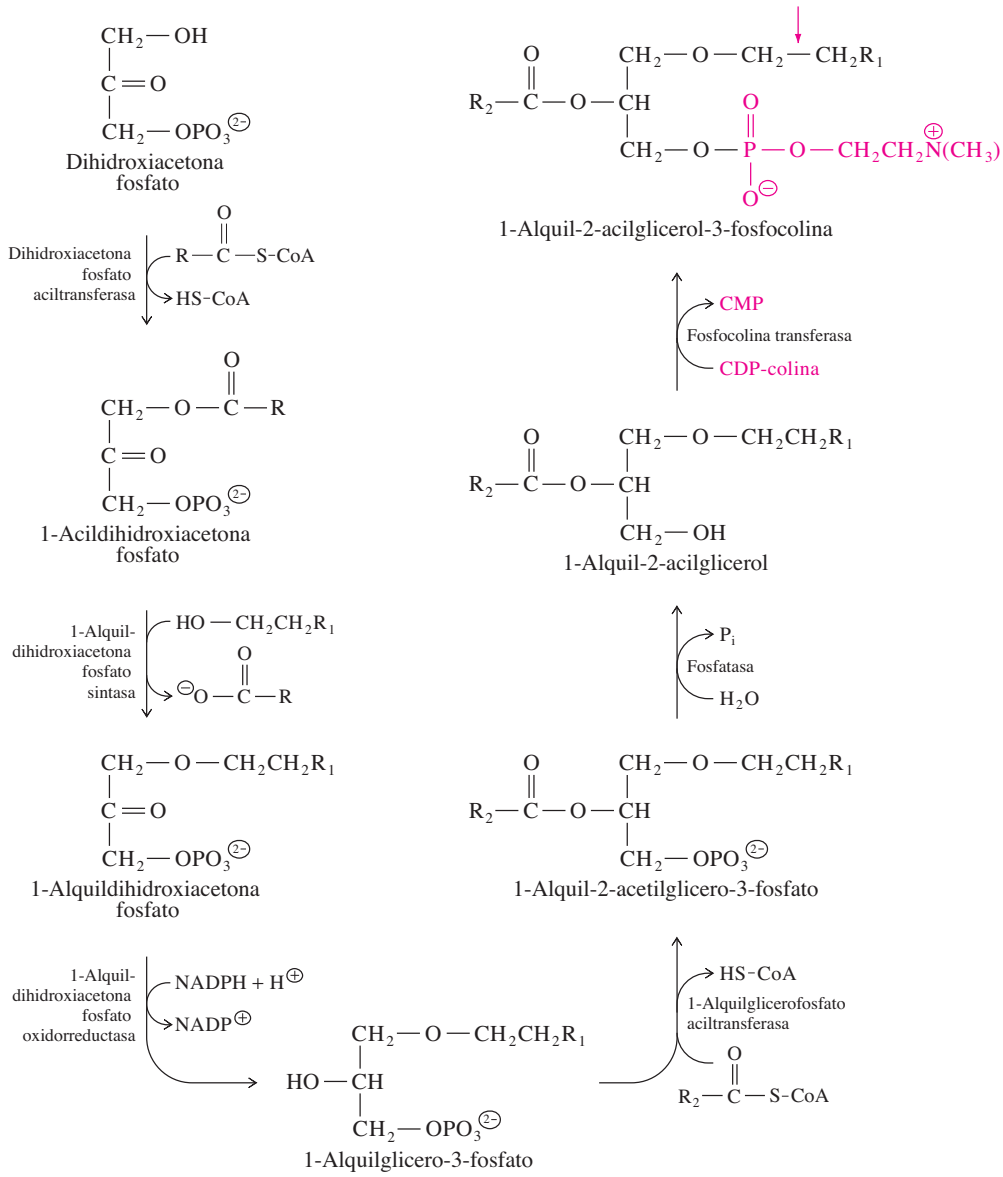


Figura 16.13 ▲
Síntesis de los lípidos éter. Los plasmalógenos se sintetizan a partir de los lípidos éter por la formación de un doble enlace en la posición marcada con una flecha gris.

plasmalógenos, que contienen un enlace de éter vinílico en el C-1 del respaldo del glicerol (figura 9.9) se forman a partir de éteres alquílicos por oxidación del enlace éter-alquilo. Esta reacción es catalizada por una oxidasa que requiere NADH y O_2. La oxidasa es parecida a las acil-CoA desaturasas (figura 16.7) que introducen dobles enlaces en los ácidos grasos.

16.5 Síntesis de esfingolípidos

Los esfingolípidos son lípidos de membrana que tienen esfingosina (un aminoalcohol no saturado con C_{18}) como su base estructural (figura 9.10). En el primer paso de la biosíntesis de los esfingolípidos, se condensa serina (una unidad con C_3) con el palmitoíl-CoA,

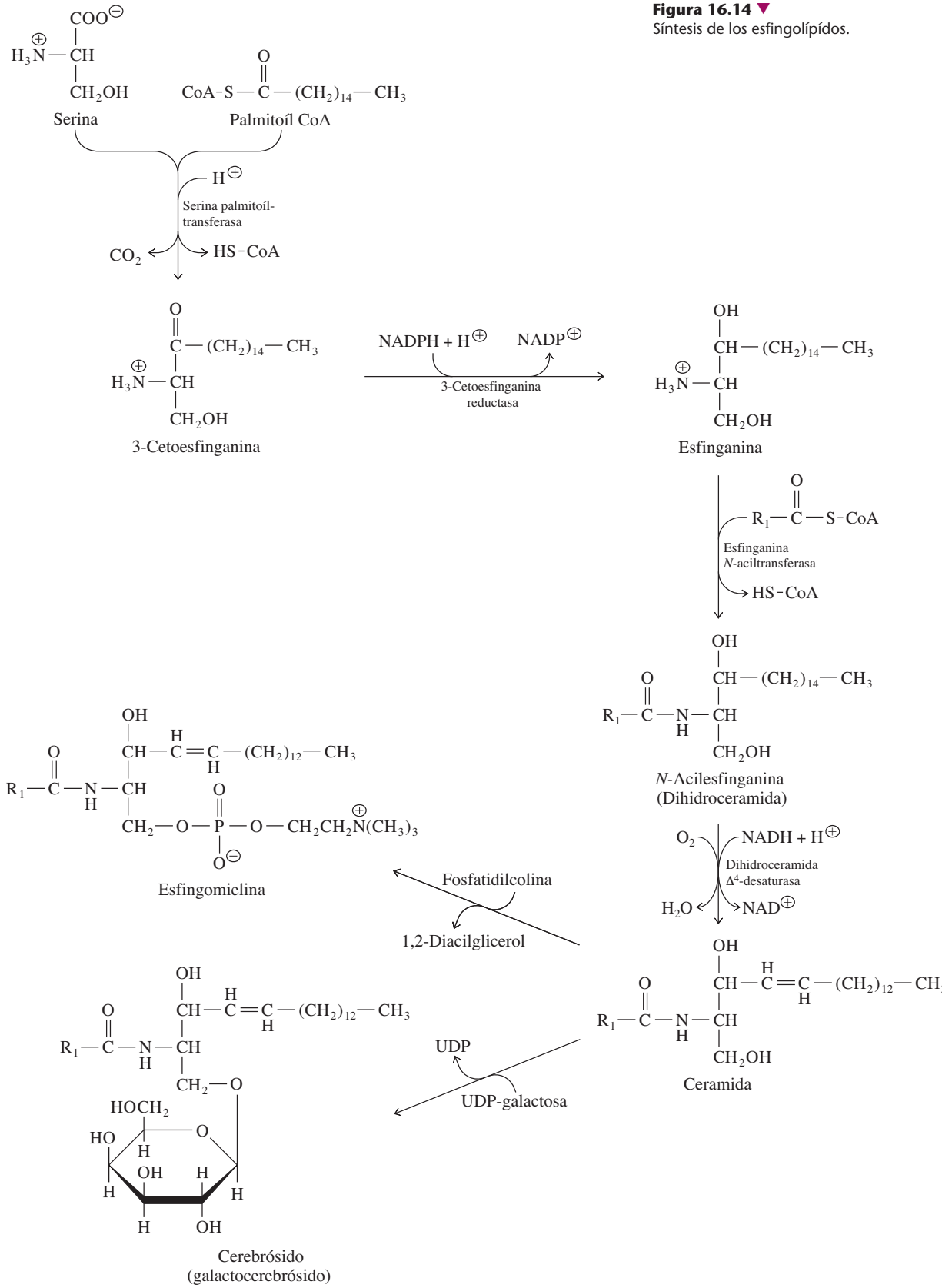
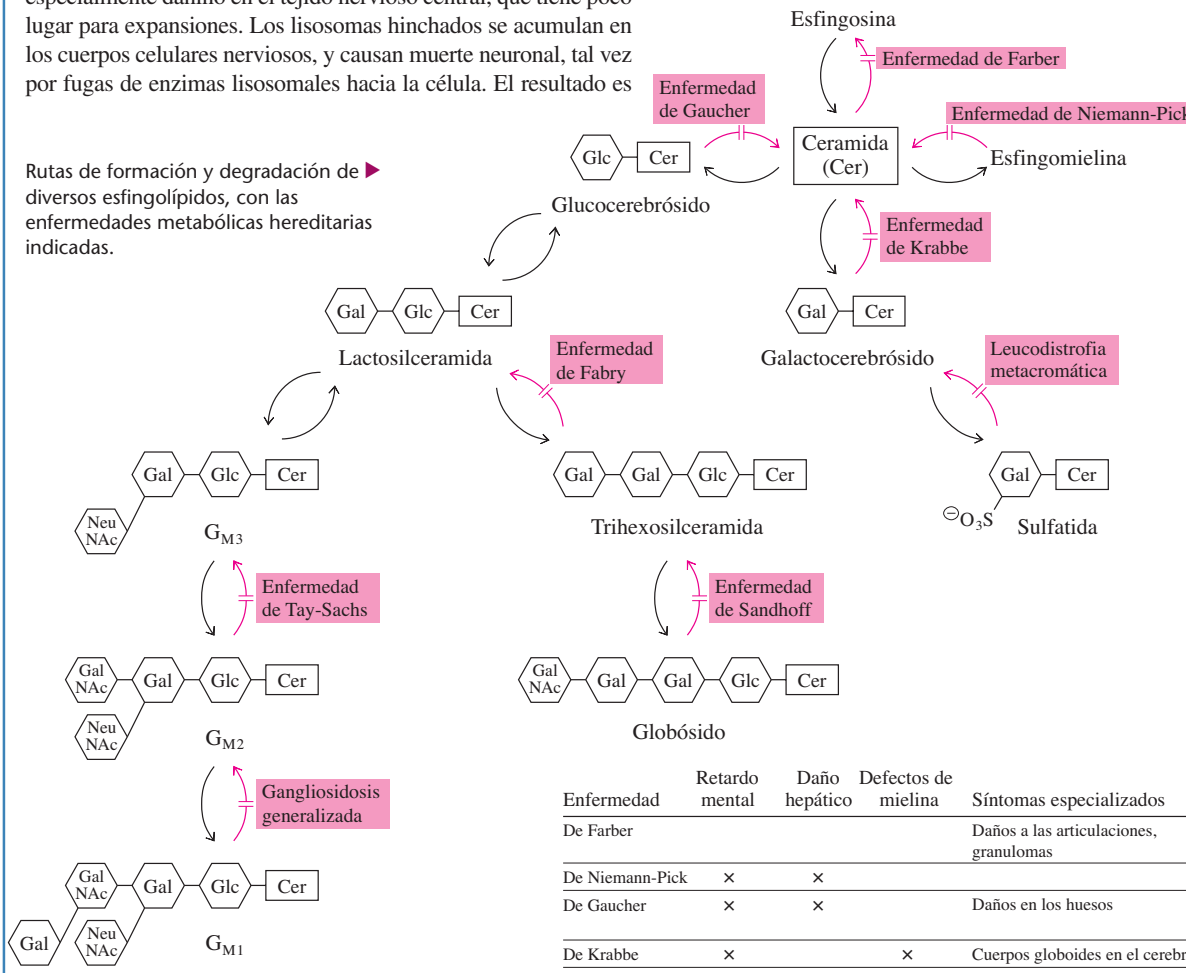


Figura 16.14 ▼
Síntesis de los esfingolípidos.

RECUADRO 16.2 Enfermedades por almacenamiento lisosoma

No hay enfermedades metabólicas asociadas a defectos en las rutas de la biosíntesis de los esfingolípidos. Es probable que las mutaciones de los genes para las enzimas biosintéticas sean letales, ya que los esfingolípidos son componentes esenciales de las membranas. En contraste, los defectos en la ruta de la degradación de esfingolípidos pueden tener graves consecuencias clínicas. El catabolismo de los esfingolípidos se efectúa principalmente en los lisosomas celulares. Los lisosomas contienen diversas glucosidasas que catalizan la eliminación hidrolítica escalonada de azúcares en las cadenas de los oligosacáridos de los esfingolípidos. Hay varios errores del metabolismo en recién nacidos, donde un defecto genético causa una deficiencia en determinada enzima lisosomal de degradación. La acumulación de subproductos lipídicos no degradables puede hacer que los lisosomas se hinchen y causen agrandamientos celulares, y tisulares en último término. Esto es especialmente dañino en el tejido nervioso central, que tiene poco lugar para expansiones. Los lisosomas hinchados se acumulan en los cuerpos celulares nerviosos, y causan muerte neuronal, tal vez por fugas de enzimas lisosomales hacia la célula. El resultado es que pueden sobrevenir ceguera, retardo mental y muerte. Por ejemplo, en la enfermedad de Tay-Sachs hay una deficiencia de hexosaminidasa A, que cataliza la eliminación de *N*-acetilgalactosamina de la cadena de oligosacáridos en los gangliósidos. Si no hay eliminación de este azúcar, se bloquea la descomposición de los gangliósidos y se acumula el ganglósido G_{M2}, subproducto no degradable. (La estructura completa del ganglósido G_{M2} se muestra en la figura 9.12).

En la figura siguiente se muestran rutas esquemáticas de formación y degradación de diversos esfingolípidos. Allí se pueden ver varios defectos en el metabolismo de los esfingolípidos, cuyas manifestaciones clínicas se llaman esfingolipidosis.



Rutas de formación y degradación de diversos esfingolípidos, con las enfermedades metabólicas hereditarias indicadas.

Enfermedad	Retardo mental	Daño hepático	Defectos de mielina	Síntomas especializados	Fatal
De Farber				Daños a las articulaciones, granulomas	×
De Niemann-Pick	×	×			×
De Gaucher	×	×		Daños en los huesos	Con frecuencia
De Krabbe	×		×	Cuerpos globoides en el cerebro	
De Fabry				Erupciones, falla de riñones	
Lucodistrofia metacromática	×		×	Parálisis, demencia	
De Tay-Sachs	×			Ceguera, ataques	×
De Sandhoff	×			Igual que Tay-Sachs; avanza con más rapidez	×
Gangliosidosis generalizada	×	×		Daños a los huesos	×

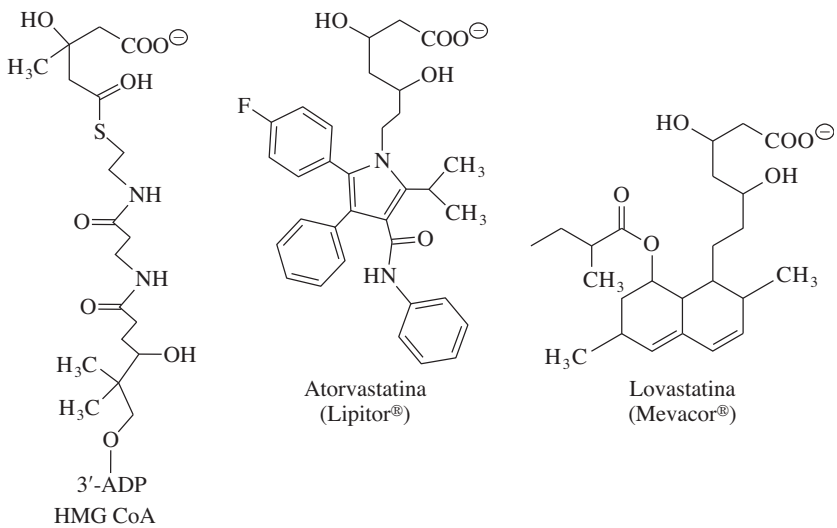
y se produce 3-cetoesfinganina y CO_2 (figura 16.14). La reducción de la 3-cetoesfinganina por NADPH produce esfinganina. A continuación un grupo acilo graso se transfiere de la acil-CoA al grupo amino de la esfinganina, en una reacción de acilación en el *N*. El producto de esta reacción es dihidroceramida, o ceramida sin el doble enlace característico entre el C-4 y C-5 de una esfingosina típica. El doble enlace se introduce en una reacción catalizada por la dihidroceramida Δ^4-desaturasa, enzima parecida a otras desaturasas que se han encontrado. El producto final es la ceramida (*N*-acilesfingosina).

La ceramida es la fuente de todos los demás esfingolípidos. Puede reaccionar con la fosfatidilcolina para formar la esfingomielina, o un UDP-azúcar para formar un cerebrósido. Se pueden formar conjugados de azúcar-lípido, gangliósidos complejos, por reacción de un cerebrósido con más UDP-azúcares y ácido CMP-*N*-acetilneuramínico (figura 9.12). Los gangliósidos se encuentran en la hojilla externa de la membrana plasmática, igual que la mayor parte de los glucolípidos.

RECUADRO 16.3 Regulación de las concentraciones del colesterol

Al parecer, la reacción de la HMG-CoA reductasa es el sitio principal para regular la síntesis del colesterol. La HMG-CoA reductasa tiene tres mecanismos de regulación: modificación covalente, represión de la transcripción y control de la degradación, que la hacen una de las enzimas más reguladas que se conocen. El control a corto plazo es influido por la modificación covalente: la HMG-CoA reductasa es una enzima interconvertible que se desactiva por fosforilación. Esa fosforilación es catalizada por una excepcional proteína cinasa, activada por AMP, que también puede catalizar la fosforilación e inactivación concomitante de la acetil-CoA carboxilasa (sección 16.9). La acción de la cinasa parece disminuir la síntesis del colesterol y de los ácidos grasos, ambas consumidoras de ATP, cuando suben las concentraciones de AMP. La cantidad de la HMG-CoA reductasa en las células también está estrechamente controlada. El colesterol (colesterol endógeno liberado por las lipoproteínas en el plasma, o el de la dieta, liberado por los quilomicrones) puede suprimir la transcripción del gen que codifica la HMG-CoA reductasa. Además, las altas concentraciones del colesterol y sus derivados aumentan la velocidad de degradación de la HMG-CoA reductasa, quizá al aumentar la velocidad de transporte de la enzima unida a la membrana hacia el sitio de su degradación.

Al disminuir las concentraciones del colesterol en el suero disminuye el riesgo de la cardiopatía coronaria. Varios medicamentos, llamados estatinas, son inhibidores potentes de la HMG-CoA reductasa. Con frecuencia se usan las estatinas como parte del tratamiento de la hipercolesterolemia. Pueden hacer bajar con eficacia las concentraciones de colesterol en la sangre. Otro método es unir sales biliares en el intestino a partículas de resina, para evitar su reabsorción. Entonces se debe convertir más colesterol a sales biliares. Quizá la inhibición de la HMG-CoA reductasa no sea el método más adecuado para controlar la concentración del colesterol, porque se necesita mevalonato para la síntesis de moléculas importantes, como la ubiquinona.



◀ Estructura de HMG-CoA y dos estatinas comunes.

16.6 Síntesis del colesterol

El colesterol es un esteroide (sección 9.6) y es un componente importante de muchas membranas, así como un precursor de las hormonas esteroides y las sales biliares en los mamíferos. Todos los átomos de carbono del colesterol provienen de la acetil-CoA, hecho que se determinó en los primeros experimentos de marcado con radioisótopos. El escualeno, un hidrocarburo lineal con C_{30}, es un compuesto intermedio en la biosíntesis de la molécula de colesterol que tiene 27 carbonos. El escualeno se forma a partir de unidades de cinco carbonos relacionadas con el isopreno. Así, las etapas de la ruta de biosíntesis de colesterol son

$$\text{Acetato } (C_2) \longrightarrow \text{Isoprenoide } (C_5) \longrightarrow \text{Escualeno } (C_{30}) \longrightarrow \text{Colesterol } (C_{27}) \qquad \textbf{(16.6)}$$

A. Etapa 1: De acetil-CoA a isopentenil difosfato

El primer paso en la síntesis del colesterol es la condensación sucesiva de tres moléculas de acetil-CoA. Esos pasos de condensación son catalizados por la acetoacetil-CoA tiolasa y la HMG-CoA sintasa. El producto es HMG CoA, y se reduce a continuación a

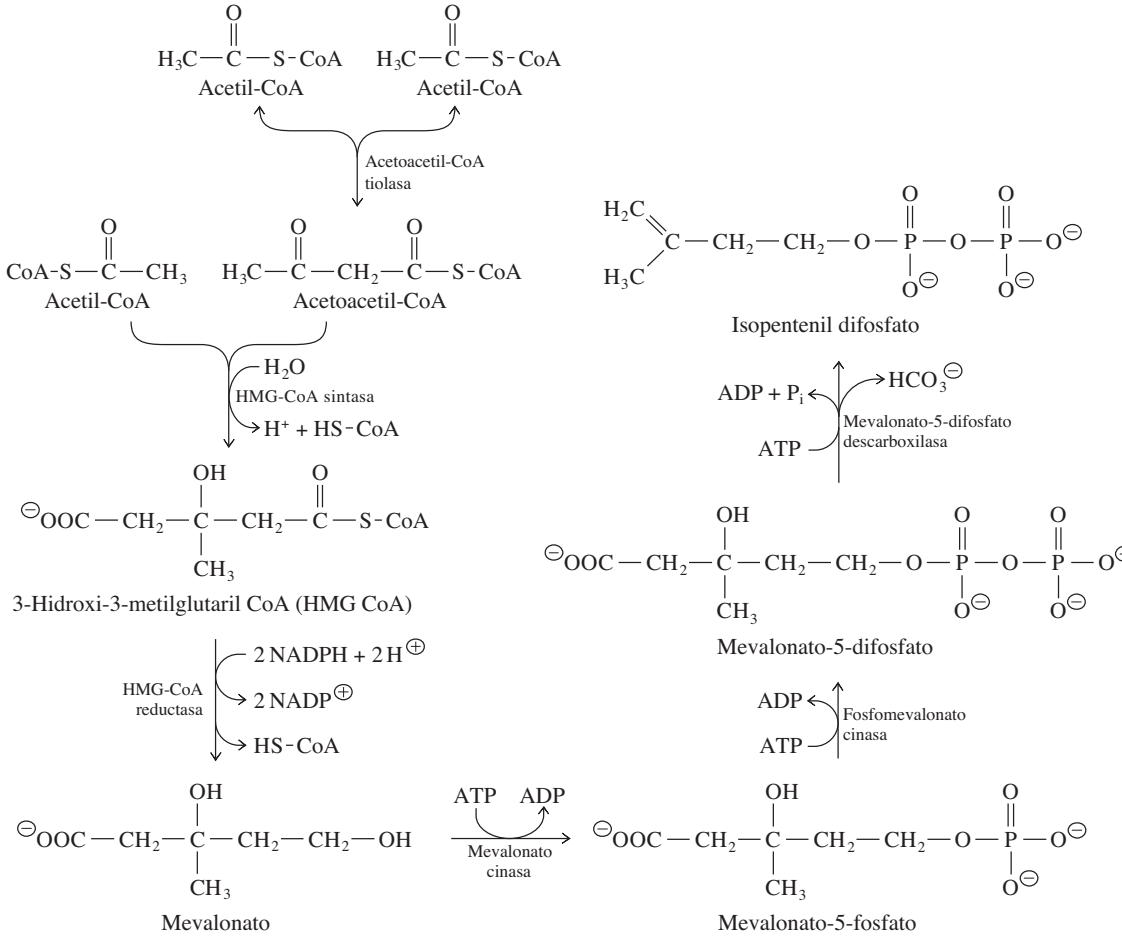


Figura 16.15 ▲
Etapa 1 de la síntesis del colesterol: formación de isopentenil difosfato. La condensación de tres moléculas de la acetil-CoA forma la HMG CoA, que se reduce a mevalonato. El mevalonato se convierte entonces a la molécula isopentenil difosfato, de cinco carbonos, con dos fosforilaciones y una descarboxilación.

Las isozimas mitocondriales de acetoacetil-CoA tiolasa y de HMG-CoA sintasa intervienen en la síntesis de los cuerpos cetónicos. (Sección 16.11).

mevalonato en una reacción catalizada por la HMG-CoA reductasa (figura 16.15). Este es el primer paso comprometido en la síntesis del colesterol. El mevalonato se convierte en isopentil difosfato, compuesto con C_5, por dos fosforilaciones seguidas mediante una descarboxilación. La conversión de dos moléculas de acetil-CoA en isopentenil difosfato requiere energía en forma de tres ATP y dos NADPH. Además de ser necesario en la síntesis del colesterol, el isopentenil difosfato es el donador importante de las unidades de isoprenil para muchas otras reacciones de biosíntesis.

Numerosas especies de bacterias tienen una ruta totalmente diferente, independiente del mevalonato, para la síntesis del isopentenil difosfato. Los precursores iniciales en esta ruta son el gliceraldehído 3-fosfato más piruvato, y no la acetil-CoA. La ruta independiente del mevalonato es más antigua que la dependiente del mevalonato, que se explica aquí.

B. Etapa 2: De isopentenil difosfato a escualeno

El isopentenil difosfato se convierte en dimetilalil difosfato por una isomerasa específica llamada isopentenil difosfato isomerasa (IDI). Los dos isómeros se unen a continuación en una reacción de condensación de cabeza con cola, catalizada por la prenil transferasa (figura 16.16). El producto de esta reacción es una molécula con C_{10} (geranil difosfato) y se libera pirofosfato. Una segunda reacción de condensación, catalizada también por la prenil transferasa, produce el importante compuesto intermedio con C_{15}, farnesil difosfato. La condensación de unidades de isoprenil produce un hidrocarburo ramificado característico, con dobles enlaces uniformemente repartidos en la posición de ramificación. Estas unidades de isopreno (figura 9.13) existen en varios cofactores importantes.

Se unen dos moléculas de farnesil difosfato en condensación de cabeza con cabeza para formar la molécula de escualeno, con C_{30}. El pirofosfato, cuya hidrólisis impulsa al equilibrio hacia la terminación, se produce en tres etapas en la ruta de la síntesis del escualeno.

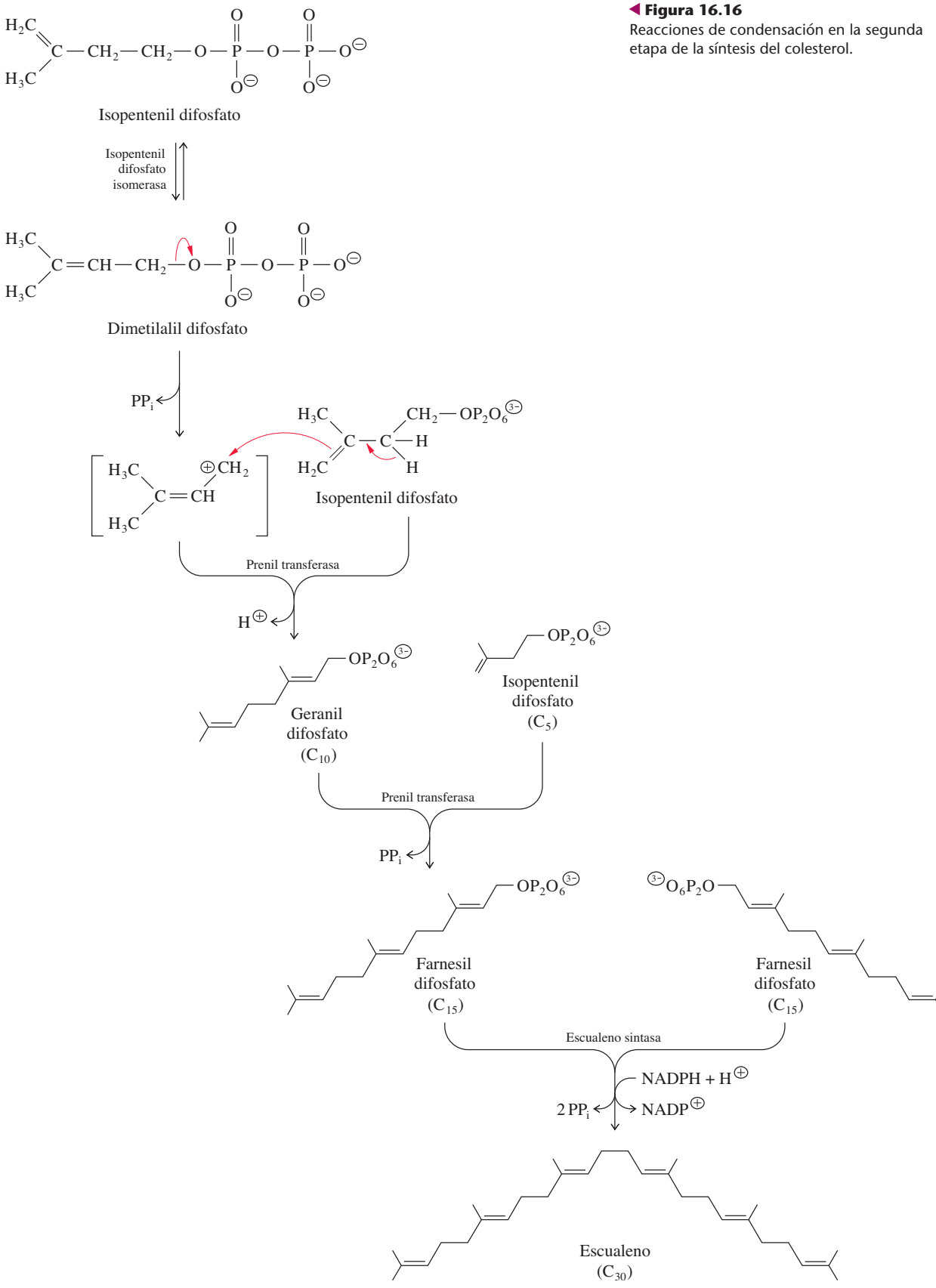
C. Etapa 3: De escualeno a colesterol

Los pasos entre el escualeno y el lanosterol, que es el primer compuesto intermedio totalmente ciclado, incluyen la adición de un átomo de oxígeno seguida por una serie concertada de ciclaciones para formar el núcleo esteroide, de cuatro anillos (figura 16.17, página 498). El lanosterol se acumula en cantidades apreciables en las células que sintetizan activamente el colesterol. La conversión del lanosterol en colesterol se efectúa por dos rutas, y ambas son de muchos pasos.

D. Otros productos del metabolismo de isoprenoides

Del colesterol o de sus precursores se sintetizan numerosos isoprenoides. El isopentenil difosfato, precursor del escualeno con C_5, es el precursor de una gran cantidad de productos, como las quinonas, las vitaminas lipídicas A, E y K, los carotenoides, los terpenos, las cadenas laterales de algunos grupos hemo de citocromo y la cadena lateral de fitol en la clorofila (figura 16.18, página 498). Muchos de estos isoprenoides se producen en las bacterias, que no sintetizan colesterol. Las dos rutas de biosíntesis del isopentenil difosfato (sección 16.6A) son mucho más antiguas que la más reciente ruta de biosíntesis del colesterol.

El colesterol es el precursor de las sales biliares, que facilitan la absorción intestinal de los lípidos; la vitamina D que estimula la absorción de Ca^{2+} en el intestino; las hormonas esteroides, como la testosterona y el β-estradiol, que controlan las características sexuales, y los esteroides, que controlan el equilibrio de las sales. El producto principal de la síntesis de los esteroides en los mamíferos es el colesterol mismo, que modula la fluidez de las membranas y es un componente esencial de la membrana plasmática de las células animales.



◀ Figura 16.16
Reacciones de condensación en la segunda etapa de la síntesis del colesterol.

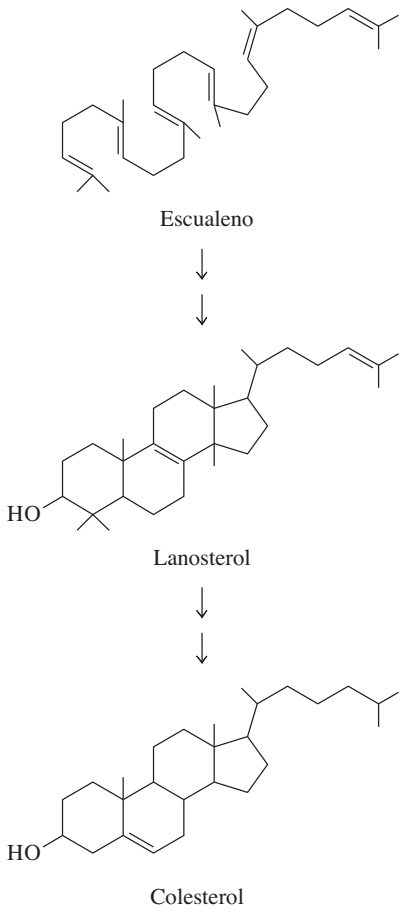


Figura 16.17 ▲
Etapa final de la síntesis del colesterol: escualeno a colesterol. La conversión de lanosterol a colesterol tiene hasta 20 pasos.

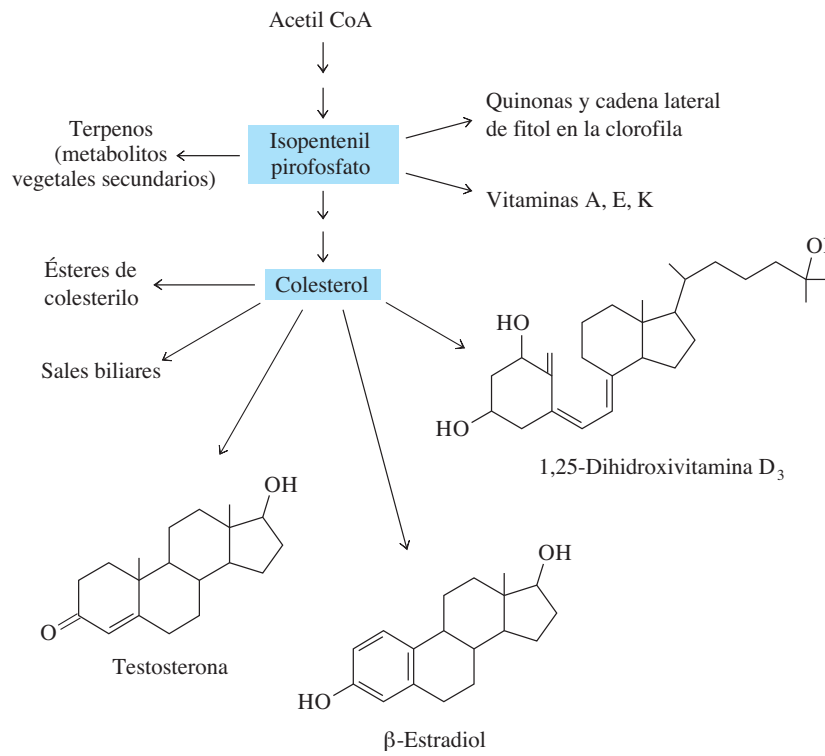


Figura 16.18 ▲
Otros productos del metabolismo del isopentenil pirofosfato y del colesterol.

16.7 Oxidación de ácidos grasos

Los ácidos grasos se oxidan por una ruta que los degrada en dos carbonos cada vez. Los fragmentos de dos carbonos se transfieren a la coenzima A para formar acetil-CoA y el resto del ácido graso vuelve a entrar a la ruta oxidante. Este proceso de degradación se llama ruta de la β-oxidación, porque se oxida el átomo de carbono-β (C-3) del ácido graso. La oxidación del ácido graso se divide en dos etapas: activación de ácidos grasos y degradación de los fragmentos con dos carbonos (como acetil-CoA). El NADH y el ubiquinol (QH_2) producidos por la oxidación de los ácidos grasos se pueden oxidar con la cadena de transporte de electrones respiratoria, y la acetil-CoA puede entrar al ciclo del ácido cítrico.

La acetil-CoA se puede oxidar totalmente en el ciclo del ácido cítrico para producir energía (en forma de ATP), que se puede usar en otras rutas bioquímicas. Los átomos de carbono de los ácidos grasos se pueden usar también como sustratos para la síntesis de los aminoácidos, ya que varios de los compuestos intermedios en el ciclo del ácido cítrico se desvían a rutas de biosíntesis de los aminoácidos (sección 13.6). En los organismos que poseen una ruta del glioxilato (sección 13.7), la acetil-CoA de la oxidación de los ácidos grasos se puede usar para sintetizar la glucosa mediante la ruta de la gluconeogénesis.

Las rutas de síntesis de aminoácidos se describirán en el capítulo 17.

La oxidación de los ácidos grasos se efectúa como parte de la renovación normal de los lípidos de membrana. Así, tanto las bacterias, como los protistas, hongos, plantas y animales tienen una ruta de la β-oxidación. Además de su papel en el metabolismo celular normal, la oxidación de los ácidos grasos es parte importante del metabolismo del combustible en los animales. Un porcentaje importante del alimento en la dieta consiste en lípidos de membrana, y en grasas, y esta rica fuente de energía se aprovecha oxidando los ácidos grasos. En esta sección se describirán las rutas bioquímicas básicas de la

oxidación de los ácidos grasos. En las próximas secciones se estudiará el papel de la oxidación de los ácidos grasos en el metabolismo de combustibles en los mamíferos.

La activacion de los ácidos grasos por oxidación es catalizada por la acil-CoA sintetasa (figura 16.6). Éste es el mismo paso de activación que se requiere para la síntesis de los ácidos grasos poliinsaturados y del complejo de lípidos.

A. Reacciones de la β-oxidación

En los eucariotas, la β-oxidación se efectúa en las mitocondrias y en organelos especializados llamados peroxisomas. En las bacterias, las reacciones se efectúan en el citosol. Se requieren cuatro pasos para producir la acetil-CoA a partir de acil-CoA graso: oxidación, hidratación, más oxidación y tiólisis (figura 16.19). Primero se examinará la oxidación de un ácido graso saturado con número par de átomos de carbono.

En el primer paso de oxidación, la acil-CoA deshidrogenasa cataliza la formación de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del grupo acilo, formando *trans*-2-enoíl-CoA. Hay varias isozimas de la acil-CoA deshidrogenasa separadas, cada una con una preferencia hacia cadenas de diferente longitud: corta, mediana, larga o muy larga.

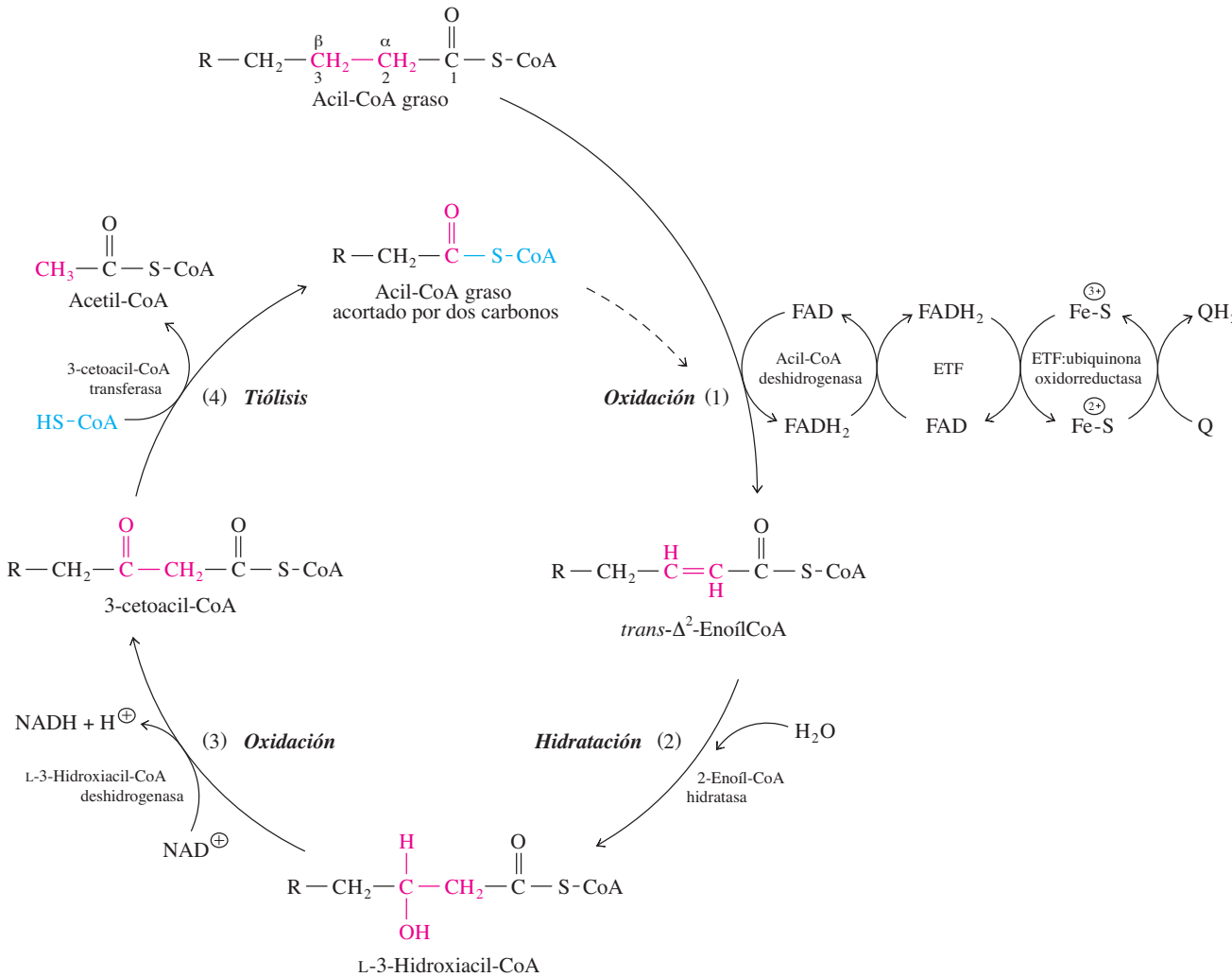
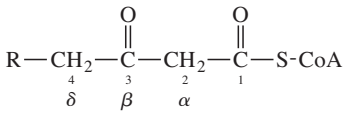


Figura 16.19 ▲
β-Oxidación de los ácidos grasos saturados. Una ronda de la β-oxidación consiste en cuatro reacciones catalizadas por enzimas. Cada ronda genera una molécula de QH_2, una de NADH, una de acetil-CoA y una molécula de acil-CoA graso, dos átomos de carbono más cortos que la molécula que entró en la ronda. (ETF es la flavoproteína de transferencia de electrones, una coenzima de proteína hidrosoluble).



3-cetoacil CoA
(3-oxoacil CoA)
(β-cetoacil CoA)

Cuando se forma el doble enlace, los electrones del acil-CoA graso se transfieren al grupo prostético FAD de la acil-CoA deshidrogenasa, y después a otro grupo prostético FAD, unido a una proteína coenzima hidrosoluble y móvil, llamada flavoproteína de transferencia de electrones (ETF, *electron transferring flavoprotein*). (La ETF también acepta electrones de varias flavoproteínas no relacionadas con el metabolismo de los ácidos grasos). A continuación los electrones pasan a la QH_2 en una reacción catalizada por la ETF:ubiquinona oxidorreductasa. Esta enzima está embebida en la membrana, y el QH_2 de la oxidación de los ácidos grasos entra a la reserva de QH_2, que se puede oxidar por el sistema de transporte de electrones asociado a membrana.

El segundo paso es una reacción de *hidratación*. Se añade agua a la *trans*-2-enoíl-CoA producida en el primer paso, para formar el isómero L de la 3-hidroxiacil CoA. La enzima es la 2-enoíl-CoA hidratasa.

El tercer paso es una segunda *oxidación* catalizada por la L-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa. Esta producción de 3-cetoacil-CoA a partir del 3-hidroxiacil-CoA es una reacción dependiente de $NAD^{\oplus}$. Los equivalentes que resultan (NADH) se pueden usar en forma directa en rutas de biosíntesis, o se pueden oxidar con el sistema de transporte de electrones asociado a membrana.

Por último, en el paso 4, el grupo sulfhidrilo de la HS-CoA, que es nucleofílico, ataca al carbono carbonílico de la 3-cetoacil-CoA en una reacción de escisión de tiólisis, catalizada por la 3-cetoacil-CoA tiolasa. Esta enzima, que también se llama tiolasa II, se relaciona con la acetoacil-CoA tiolasa (tiolasa I) que apareció en la ruta de isopentenil difosfato (sección 16.6A). La acetoacil-CoA tiolasa es específica de la acetoacetil-CoA, en tanto que la 3-cetoacil-CoA tiolasa actúa sobre derivados de los ácidos grasos de cadena larga. La liberación de la acetil-CoA deja una molécula de acil-CoA graso acortada en dos carbonos. Esta molécula de acil-CoA es sustrato para otra ronda de las cuatro reacciones, y la espiral metabólica continúa hasta que toda la molécula se haya convertido en la acetil-CoA. Al acortarse la cadena del acilo graso, el primer paso es catalizado por isozimas de acil-CoA deshidrogenasa, con preferencias para las cadenas más cortas. Es interesante que las tres primeras reacciones de oxidación de los ácidos grasos son paralelas, químicamente, a los tres pasos del ciclo del ácido cítrico, y en consecuencia se recuerdan con facilidad. En estas reacciones se oxida un grupo etileno (— CH_2CH_2 —, como en el succinato) para formar una unidad con dos carbonos, que contiene un grupo carbonilo (— $COCH_2$ —, como en el oxaloacetato). Los pasos son las reacciones inversas a las de la ruta de síntesis de los ácidos grasos (sección 16.1C).

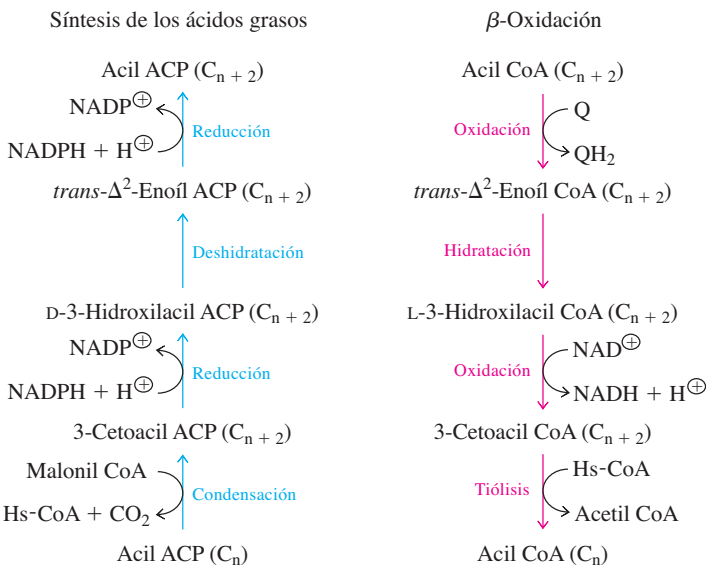
En los eucariotas, la oxidación de los ácidos grasos también se efectúa en los peroxisomas. De hecho, en la mayor parte de los eucariotas los peroxisomas son el único sitio de la β-oxidación de los ácidos grasos. En ellos, el paso inicial de la oxidación es catalizado por la acil-CoA oxidasa, enzima homóloga a la acil-CoA deshidrogenasa que cataliza la primera oxidación en las mitocondrias. La enzima peroxisomal transfiere electrones al O_2 para formar H_2O_2.

$$\text{Acil-CoA graso} \xrightarrow{\text{Acil-CoA oxidasa}} \textit{trans}\text{-}\Delta^2\text{-Enoíl CoA} + H_2O_2 \quad \textbf{(16.7)}$$

En la β-oxidación bacteriana y mitocondrial, el producto del primer paso de oxidación es la QH_2, que se alimenta en la cadena de transporte de electrones respiratorio. Eso da como resultado la síntesis de ATP: cada molécula de QH_2 equivale a 1.5 moléculas de ATP (sección 14.11). No hay sistema de transporte de electrones asociado a membrana en los peroxisomas, y es la causa de que haya un distinto tipo de óxido-reducción en ellos. También equivale a que se produzcan menos equivalentes de ATP durante la β-oxidación peroxisómica. En los mamíferos, donde existen las rutas mitocondrial y peroxisómica, la ruta de la β-oxidación peroxisómica degrada a los ácidos grasos de cadena muy larga, ácidos grasos ramificados y ácidos dicarboxílicos de cadena larga, posiblemente también a ácidos grasos no saturados; se producen compuestos menores y más polares que pueden ser excretados. La mayor parte de los ácidos grasos comunes se degradan en las mitocondrias.

B. Síntesis de los ácidos grasos y la β-oxidación

La síntesis de los ácidos grasos consiste en la formación de enlaces carbono-carbono (condensación), seguida por los pasos de reducción, deshidratación y reducción, como



◀Figura 16.20
Síntesis de los ácidos grasos y la β-oxidación.

preparación para la siguiente reacción de condensación. Las reacciones inversas, oxidación, hidratación, oxidación y ruptura de enlace carbono-carbono, son parte de la ruta de degradación en la β-oxidación. En la figura 16.20 se comparan las dos rutas.

Los tioésteres activos en la oxidación de los ácidos grasos son derivados de la CoA, en tanto que en la síntesis de los ácidos grasos los compuestos intermedios están enlazados, como tieoésteres, a la proteína portadora de acilo (ACP). En ambos casos, los grupos acilo están unidos a fosfopanteteína. La síntesis y la degradación proceden en pasos de dos carbonos. Sin embargo, la oxidación da como resultado un producto de dos carbonos, la acetil-CoA, mientras que en la síntesis se requiere un sustrato con tres carbonos, el malonil-CoA, que transfiere una unidad de dos carbonos a la cadena creciente. En el proceso se desprende CO_2. El poder reductor para la biosíntesis es suministrado por la NADPH, en tanto que la oxidación depende del $NAD^{\oplus}$ y la ubiquinona (a través de la flavoproteína, que transfiere electrones). Por último, el compuesto intermedio en la síntesis de los ácidos grasos es el D-3-hidroxilacil-ACP, mientras que durante la β-oxidación se produce el isómero L (L-3-hidroxilacil-CoA).

Las rutas de biosíntesis y de catabolismo son catalizadas por conjuntos de enzimas totalmente distintos, y los compuestos intermedios forman reservas separadas, debido a que están unidos a distintos cofactores (CoA y ACP). En las células eucarióticas, las dos rutas opuestas están separadas físicamente. Las enzimas de biosíntesis se encuentran en el citosol, y las de la β-oxidación están confinadas en las mitocondrias y los peroxisomas.

En la sección 16.7D se compara el costo de la síntesis de los ácidos grasos para la energía recuperada en la β-oxidación

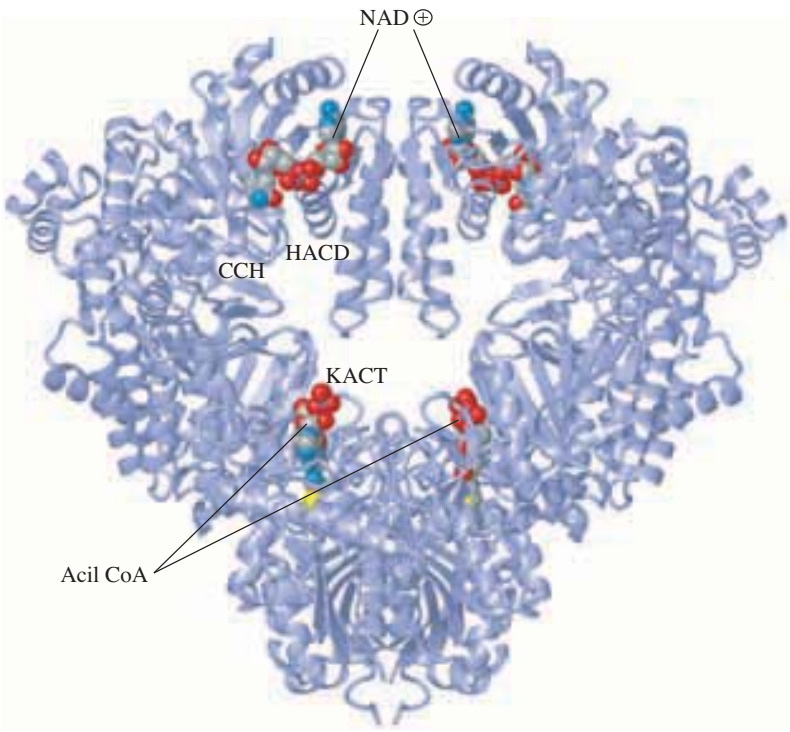
C. Transporte de acil-CoA graso al interior de las mitocondrias

El acil-CoA graso de cadena larga que se forma en el citosol no se puede difundir y atravesar la membrana mitocondrial interna y pasar a la matriz mitocondrial, donde suceden las reacciones de la β-oxidación. Hay un sistema de transporte, llamado sistema de lanzadera de carnitina, que introduce en forma activa a los ácidos grasos en las mitocondrias (figura 16.21, página 503). En el citosol, el grupo acilo del acil-CoA graso es transferido al grupo hidroxilo de la carnitina, para formar acilcarnitina en una reacción catalizada por la carnitina aciltransferasa I. Esta reacción es un sitio clave para regular la oxidación de los ácidos grasos intracelulares. La acilcarnitina es un éster de acilo y una molécula rica en energía; su energía libre de hidrólisis se parece a la de un éster tiol. Entonces, la acilcarnitina entra a la matriz mitocondrial en intercambio de la carnitina libre, por vía de la carnitina:acilcarnitina traslocasa. En la matriz mitocondrial, la carnitina aciltransferasa II, una isozima, cataliza la inversa de la reacción catalizada por la carnitina aciltransferasa I. El efecto del sistema de lanzadera de carnitina es eliminar acil-CoA graso del citosol, y regenerar el acil-CoA graso en la matriz mitocondrial.

RECUADRO 16.4 Enzima trifuncional para la β-oxidación

Muchas especies contienen una enzima trifuncional para la β-oxidación. Las actividades de la 2-enoíl-CoA hidratasa (ECH) y de la L-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (HACD) están en una sola cadena de polipéptido (subunidad α). La actividad de la 3-cetoacil-CoA tiolasa (KACT) está ubicada en la subunidad β y las dos subunidades se combinan para formar una proteína con estructura cuaternaria $\alpha_2\beta_2$.

La estructura de la enzima bacteriana se muestra a continuación. Durante la β -oxidación, el producto de la primera reacción, *trans*-2-enoíl CoA, se une al sitio de ECH en la enzima trifuncional. A continuación el sustrato pasa por las tres reacciones siguientes dentro de la cavidad formada por los sitios activos ECH, HACD y KACT. No se producen compuestos intermedios durante estas reacciones, porque están enlazados por sus términos CoA. Éste es un ejemplo de canalización metabólica por un complejo multienzimático.



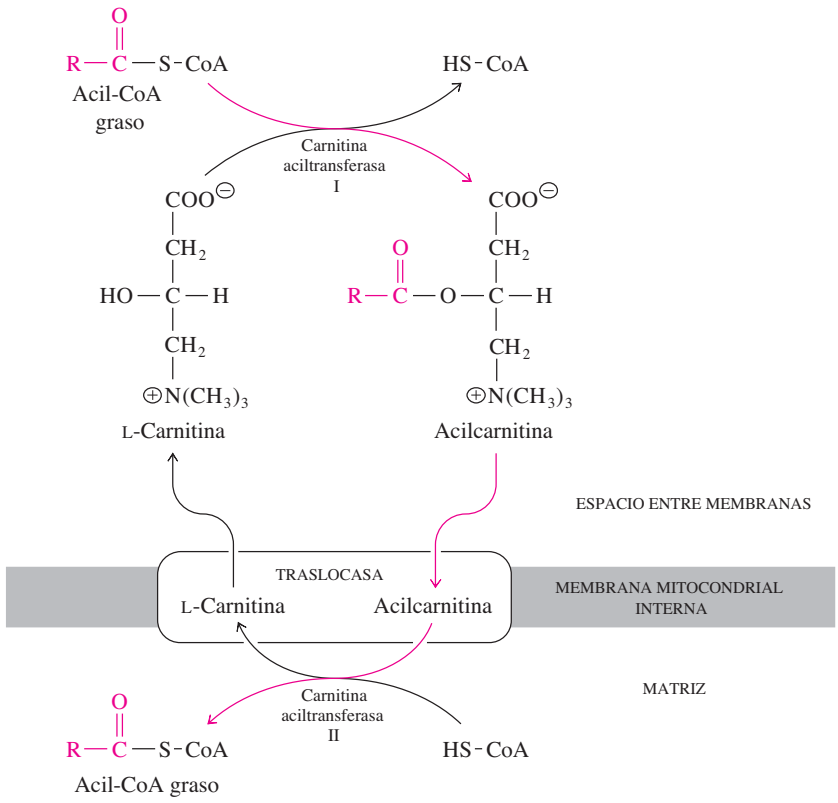
◀ Estructura del complejo multienzimático para oxidación del ácido graso en β, en la bacteria *Pseudomonas fragi*. En esta estructura, una molécula de acil-CoA está unida a cada uno de los sitios KACT. [PDB 1WDK]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

D. Generación de ATP a partir de la oxidación de los ácidos grasos

La oxidación completa de los ácidos grasos suministra más energía que la oxidación de una cantidad equivalente de glucosa. Como en el caso de la glicólisis, la producción de energía por oxidación de los ácidos grasos se puede calcular a partir de la producción teórica total de ATP (sección 13.4). Un ejemplo es la ecuación balanceada de la oxidación completa de una molécula de estearato (C_{18}) en ocho ciclos de la β-oxidación. El estearato se convierte en estearoíl-CoA al costo de dos equivalentes de ATP, y la oxidación de la estearoíl-CoA produce la acetil-CoA y las coenzimas reducidas QH_2 y NADH.

$$\text{Estearoíl CoA} + 8\ \text{HS—CoA} + 8\ \text{Q} + 8\ \text{NAD}^{\oplus} \longrightarrow$$
$$9\ \text{Acetil CoA} + 8\ \text{QH}_2 + 8\ \text{NADH} + 8\ \text{H}^{\oplus} \qquad \textbf{(16.8)}$$

Se puede calcular la producción teórica a partir de nueve moléculas de acetil-CoA, suponiendo que entran al ciclo del ácido cítrico, donde se oxidan por completo a CO_2. Esas reacciones producen 10 equivalentes de ATP por cada molécula de acetil CoA. El rendimiento neto de la oxidación del estearato es de 120 moléculas de ATP.



◀Figura 16.21
Sistema de lanzadera de la carnitina para transportar el acil-CoA graso a la matriz mitocondrial. La ruta del grupo acilo se marca en gris.

8 ciclos de la β-oxidación producen

8 QH_2	$\approx$	12 ATP
8 NADH	$\approx$	20 ATP
9 moléculas de acetil-CoA	$\approx$	90 ATP
activación del estearato	$\approx$	−2 ATP
Total	=	120 ATP

Para comparar, la oxidación de la glucosa a CO_2 y agua produce unas 32 moléculas de ATP. Como el estearato tiene 18 carbonos y la glucosa tiene sólo 6, la producción de ATP se normaliza comparando la oxidación de tres moléculas de glucosa: $3 \times 32 = 96$ ATP. Este rendimiento teórico de ATP sólo es el 80% (96/120) del valor para el estearato. Los ácidos grasos suministran más energía por átomo de carbono que los carbohidratos, porque éstos ya están parcialmente oxidados. Además, como las mitades de ácido graso son hidrofóbicas, pueden almacenarse en grandes cantidades en forma de triacilgliceroles, sin grandes cantidades de agua combinada, como la tienen los carbohidratos. El almacenamiento anhidro permite guardar mucho más energía por gramo.

También se puede calcular el costo de sintetizar estearato para compararlo con la energía recuperada durante la β-oxidación. Para este cálculo se necesita conocer el costo de sintetizar acetil-CoA a partir de CO_2. Este valor (17 equivalentes de ATP) se obtiene de las reacciones de fijación de CO_2 en las plantas (sección 15.4C).

8 acetil-CoA → 8 malonil ACP		$\approx$	8 ATP
8 pasos de síntesis	16 NADPH	$\approx$	40 ATP
9 acetil-CoA	9×17	$\approx$	153 ATP
Total		=	201 ATP

La energía recuperada en la degradación del estearato es el 60% (120/201) de la energía total teórica necesaria para su síntesis. Es un ejemplo típico de la eficiencia bioquímica.

E. β-Oxidación de los ácidos grasos de cadena impar y no saturados

La mayor parte de los ácidos grasos tienen una cantidad par de átomos de carbono. Los ácidos grasos de cadena impar son sintetizados por bacterias y algunos otros organismos. Estos ácidos de cadena impar se oxidan con la misma secuencia de reacciones que los ácidos grasos de cadena par, pero el producto de la escisión tiolítica final es propionil-CoA (CoA con un grupo acilo con C_3), y no acetil-CoA (CoA con un grupo acilo con C_2). En los mamíferos, la propionil-CoA se puede convertir en succinil-CoA en una ruta de tres pasos (figura 16.22). La primera reacción es catalizada por la propionil-CoA carboxilasa, enzima dependiente de la biotina que incorpora el bicarbonato a la propionil-CoA para producir la D-metilmalonil-CoA. La metilmalonil-CoA racemasa cataliza la conversión de la D-metilmalonil-CoA en su isómero L. Por último, la metilmalonil-CoA mutasa cataliza la formación del succinil-CoA.

La metilmalonil-CoA mutasa es una de las pocas enzimas que requieren la adenosilcobalamina como cofactor. En la sección 7.11 se indicó que las enzimas dependientes de adenosilcobalamina catalizan rearreglos intramoleculares en los que un átomo de hidrógeno y un sustituyente en un átomo de carbono adyacente intercambian de lugar. En la reacción catalizada por la metilmalonil-CoA mutasa, el grupo —C(O) —SCoA se intercambia por un átomo de hidrógeno de un grupo metilo (figura 7.25).

La molécula de succinil-CoA formada por acción de la metilmalonil-CoA mutasa se metaboliza a oxaloacetato. Como el oxaloacetato es un sustrato para la gluconeogénesis, el grupo propionilo derivado de la β-oxidación de un ácido graso de cadena corta se puede convertir en glucosa.

Para la oxidación de los ácidos grasos insaturados se requieren dos enzimas además de las necesarias regularmente para la oxidación de los ácidos grasos saturados. La oxidación de la coenzima A derivada del linoleato (18:2 *cis,cis*-$\Delta^{9,12}$-octadecadienoato) ilustra la ruta modificada (figura 16.23).

Como todos los ácidos grasos poliinsaturados, el linoleoíl CoA tiene dobles enlaces, tanto en los carbonos impares como en pares (sus dobles enlaces están separados por un grupo metileno). Los ácidos grasos no saturados son sustratos normales para las enzimas de la ruta de la β-oxidación, hasta que un doble enlace en carbono impar de la cadena acortada del ácido graso interfiere con la catálisis. En este ejemplo, tres rondas de la β-oxidación convierten el linoleoíl-CoA en la molécula con C_{12} de 12:2 *cis,cis*-$\Delta^{3,6}$-dienoíl-CoA (paso 1). Esta molécula tiene un doble enlace *cis*-3,4, y no el doble enlace *trans*-2,3

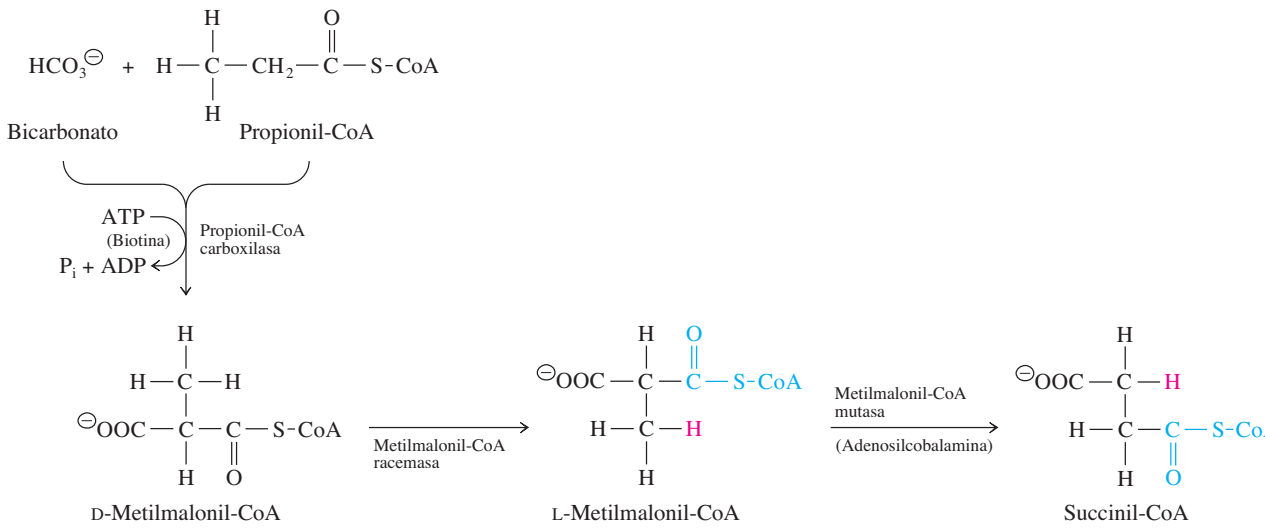
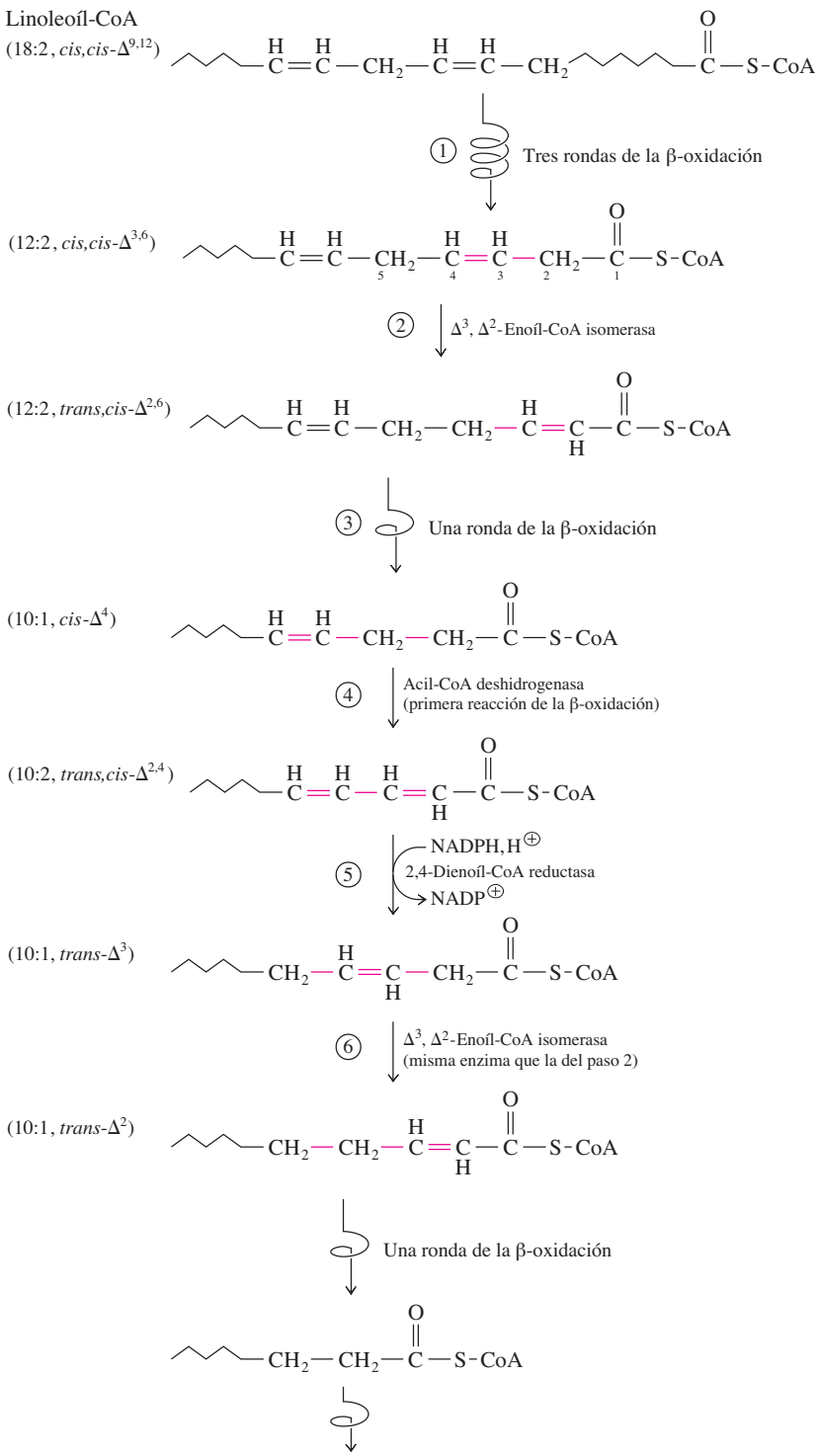


Figura 16.22 ▲
Conversión del propionil-CoA en succinil-CoA.



◀Figura 16.23
Oxidación del linoleoíl-CoA. En la oxidación se requieren dos enzimas: la enoíl-CoA isomerasa y la 2,4-dienoíl-CoA reductasa, además de las enzimas de la ruta de la β-oxidación.

normal que se produciría durante la β-oxidación de los ácidos grasos saturados. El intermedio *cis*-3,4 no es un sustrato para la 2-enoíl-CoA hidratasa, ya que la enzima normal de la β-oxidación es específica para la acil-CoA trans, y además el doble enlace está en mala posición para la hidratación.

El doble enlace inadecuado se arregla, de Δ^3 a Δ^2 para producir la molécula con C_{12} 12:2 *trans,cis*-$\Delta^{2,6}$-dienoíl CoA en una reacción catalizada por la Δ^3,Δ^2-enoíl-CoA isomerasa (paso 2). Este producto puede volver a entrar a la ruta de la β-oxidación, y se puede completar otra ronda de la β-oxidación, dando la molécula con C_{10} 10:1 *cis*-Δ^4-acil-CoA (paso 3). La primera enzima de la ruta de la β-oxidación, la acil-CoA deshidrogenasa, actúa sobre este compuesto y produce la molécula con C_{10} 10:2 *trans,cis*-$\Delta^{2,4}$-dienoíl-CoA. Este dieno, estabilizado por resonancia, resiste la hidratación. La 2,4-dienoíl-CoA reductasa cataliza la reacción, dependiente de NADPH, del dieno (paso 5) para producir una molécula con C_{10} y un solo doble enlace (10:1 *trans*-Δ^3-enoíl CoA). Este producto (como el sustrato en el paso 2) actúa sobre la Δ^3,Δ^2-enoíl-CoA isomerasa para producir un compuesto que continúa en la ruta de la β-oxidación. Nótese que la isomerasa puede convertir los dobles enlaces, tanto el *cis*-Δ^3 como el *trans*-Δ^3, y formar el compuesto intermedio trans-Δ^2.

La oxidación de un ácido graso monoinsaturado con un enlace *cis*-Δ^3 y *trans*-Δ^3 al mismo tiempo en un carbono con número impar (por ejemplo, oleato) requiere la actividad de la isomerasa, pero no la reductasa, además de las enzimas de la β-oxidación. El oleoíl (18:1 *cis*-Δ^3) CoA pasa por tres ciclos de la β-oxidación y forma tres moléculas de acetil-CoA y el éster de CoA del ácido (12:1 *cis*-Δ^3). Entonces, la Δ^3,Δ^2-enoíl-CoA isomerasa cataliza la conversión de la acil-CoA de 12 carbonos en una *trans*-Δ^2 acil-CoA de 12 carbonos, que puede tener la β-oxidación.

16.8 Formación de lípidos eucarióticos en diversos sitios

Las células eucarióticas están muy compartimentalizadas. Los compartimientos pueden tener funciones muy diferentes, y las membranas que los rodean tienen constituyentes fosfolipídicos y acilo grasos muy diferentes. La mayor parte de la biosíntesis de lípidos en las células eucarióticas se efectúa en el retículo endoplásmico. Por ejemplo, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y fosfatidilserina se sintetizan en ese retículo. Las enzimas de la biosíntesis están unidas a la membrana, con sus sitios activos orientados hacia el citosol, para tener acceso a los compuestos citosólicos hidrosolubles. Los principales fosfolípidos se incorporan a la membrana del retículo endoplásmico. De allí, se transportan a otras membranas en la célula en vesículas que se mueven entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, y entre éste y diversos sitios en la membrana. Las proteínas solubles de transporte participan también llevando a los fosfolípidos y al colesterol a otras membranas.

Aunque el retículo endoplásmico es el principal sitio del metabolismo de los lípidos en la célula, también hay enzimas metabolizadoras de lípidos en otros lugares. Por ejemplo, se pueden adaptar los lípidos de membrana para tener el perfil de lípidos característico de los organelos celulares individuales. En la membrana plasmática, las actividades de la aciltransferasa catalizan la acilación de lisofosfolípidos. Las mitocondrias tienen la enzima fosfatidilserina descarboxilasa, que cataliza la conversión de la fosfatidilserina en fosfatidiletanolamina. También las mitocondrias contienen las enzimas responsables de la síntesis del difosfatidilglicerol (cardiolipina), molécula que se considera única de la mitocondria. Los lisosomas poseen diversas hidrolasas que degradan fosfolípidos y esfingolípidos. Los peroxisomas poseen enzimas que intervienen en las primeras etapas de síntesis de éter lipídicos. Los defectos en la formación de peroxisomas pueden causar síntesis defectuosa de plasmalógeno, de consecuencias potencialmente fatales. Los tejidos del sistema nervioso central son especialmente propensos a daños, y en esos tejidos los plasmalógenos constituyen una parte apreciable de los lípidos en la vaina de mielina. Con frecuencia, distintos lugares celulares tienen un conjunto distinto de enzimas (isozimas) responsables de la biosíntesis de las distintas reservas segregadas de lípidos; cada reserva tiene su propia función biológica.

16.9 En los mamíferos, el metabolismo de los lípidos es regulado por hormonas

Cuando el suministro de energía basta para satisfacer las necesidades inmediatas de un organismo, los ácidos grasos no se oxidan ya en las mitocondrias. Más bien son transportados al tejido adiposo, donde se almacenan para uso futuro, cuando se necesita energía (por ejemplo, si hay carencia de alimento). Este aspecto del metabolismo de los lípidos se parece a la estrategia del metabolismo de carbohidratos, donde se almacena el exceso de glucosa en células especializadas en forma de glucógeno (animales) o almidón (plantas).

La movilización y almacenamiento de lípidos requiere comunicación entre diversos tejidos. Las hormonas que circulan en la sangre se adaptan en forma ideal para funcionar como señales entre células. Se debe coordinar el metabolismo de lípidos con el de carbohidratos, así que no es de sorprender que sean las mismas hormonas las que afectan a la síntesis, la degradación y el almacenamiento de los carbohidratos.

Los principales reguladores hormonales del metabolismo de los ácidos grasos son el glucagon, la epinefrina y la insulina. El glucagon y la epinefrina están presentes en altas concentraciones en el estado de ayuno, y la insulina se halla en altas concentraciones en el estado saciado. La concentración de la glucosa en la circulación se debe mantener siempre dentro de límites bastante estrechos. En el estado de ayuno se agotan las reservas de carbohidratos y debe haber síntesis de ellos, para mantener la concentración de glucosa en la sangre. Para aliviar la presión sobre el suministro limitado de glucosa, se movilizan los ácidos grasos para servir de combustible, y muchos tejidos pasan por transiciones de regulación que disminuyen su uso de los carbohidratos y aumentan su uso de los ácidos grasos. Lo contrario sucede en el estado saciado, cuando se usan los carbohidratos como combustible y precursores de la síntesis de los ácidos grasos.

La enzima reguladora clave para la síntesis de los ácidos grasos es la acetil-CoA carboxilasa. Las grandes concentraciones de insulina después de un alimento inhiben la hidrólisis de los triacilgliceroles almacenados, y estimulan la formación del malonil-CoA por la acetil-CoA carboxilasa. El malonil-CoA inhibe en forma alostérica a la carnitina aciltransfeasa I. El resultado es que los ácidos grasos se quedan en el citosol, y no se transportan a las mitocondrias para su oxidación. La regulación de la síntesis y la degradación de los ácidos grasos son recíprocas, y el mayor metabolismo por una ruta se balancea con la menor actividad en la ruta opuesta. En los animales, esta regulación se logra por las hormonas que afectan en forma indirecta las actividades de las enzimas.

Los triacilgliceroles se entregan al tejido adiposo en forma de lipoproteínas que circulan en el plasma sanguíneo (sección 16.9B). Cuando llegan al tejido adiposo, son hidrolizados para liberar ácidos grasos y glicerina, que absorben los adipocitos. La hidrólisis es catalizada por la lipoproteína lipasa (LPL), una enzima extracelular unida a las células endoteliales de los capilares en el tejido adiposo. Después de entrar a los adipocitos, los ácidos grasos se vuelven a esterificar para almacenarlos como triacilgliceroles.

La movilización o liberación siguiente de los ácidos grasos desde los adipocitos depende de las necesidades metabólicas. Una lipasa sensible a hormona en los adipocitos cataliza la hidrólisis de los triacilgliceroles para liberar los ácidos grasos y los monoacilgliceroles. La lipasa sensible a hormona también puede catalizar la conversión de monoacilgliceroles a glicerol y ácidos grasos libres, es probable que una monoacilglicerol lipasa más específica y más activa lleve a cabo la mayor parte de esta actividad catalítica.

La hidrólisis de los triacilgliceroles se inhibe en el estado saciado por altas concentraciones de la insulina. Cuando se agotan las reservas de carbohidratos y son bajas las concentraciones de insulina, una mayor concentración de epinefrina estimula la hidrólisis del triacilglicerol. La epinefrina se une a los receptores β-adrenérgicos de los adipocitos, y produce la activación de la proteína cinasa A, dependiente de cAMP. La proteína cinasa A cataliza la fosforilación y activación de la lipasa sensible a hormona (figura 16.24).

El glicerol y los ácidos grasos libres se difunden por la membrana plasmática del adipocito y entran al torrente sanguíneo. El glicerol se metaboliza por el hígado, donde su

En la sección 9.12 se describieron las rutas de señalamiento por la hormona.

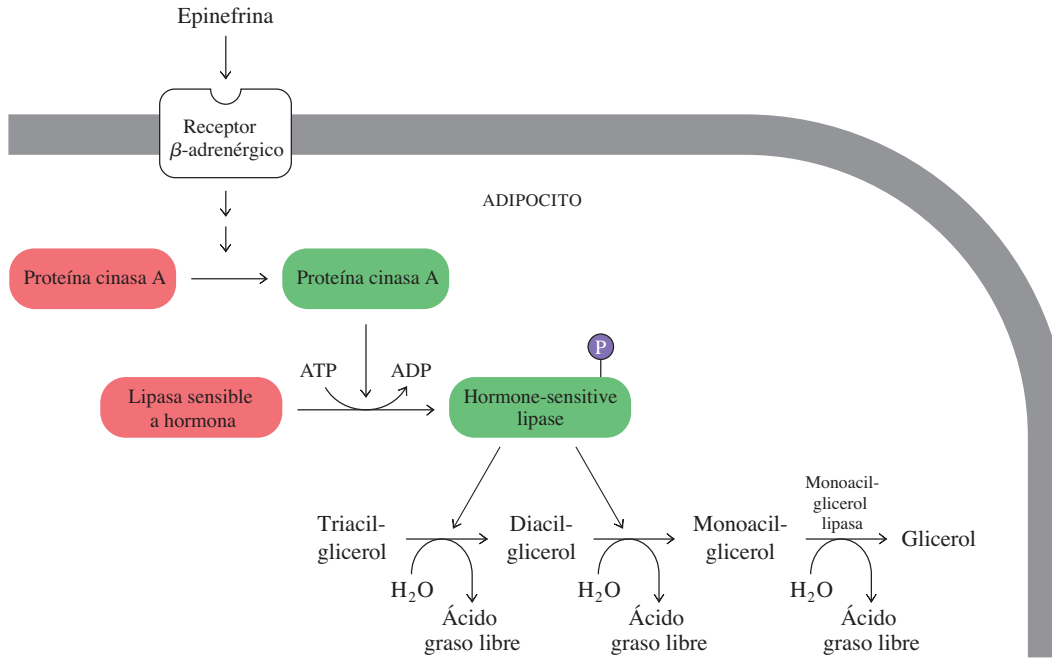


Figura 16.24 ▲
Degradación del triacilglicerol en los adipocitos. La epinefrina inicia la activación de la proteína cinasa A, que cataliza la fosforilación y activación de la lipasa sensible a la hormona. La lipasa cataliza la hidrólisis del triacilgliceroles a monoacilgliceroles y ácidos grasos libres. La hidrólisis de los monoacilgliceroles es catalizada por la monoacilglicerol lipasa.

mayor parte se convierte en glucosa mediante gluconeogénesis. Los ácidos grasos libres son poco solubles en soluciones acuosas, y van por la sangre unidos a la albúmina del suero (sección 16.9C). Son transportados a los tejidos como el corazón, el músculo esquelético y el hígado, donde se oxidan en las mitocondrias para liberar energía. Los ácidos grasos son una fuente principal de energía durante el ayuno (por ejemplo, cuando dormimos).

Al mismo tiempo, un aumento en las concentraciones de glucagon inactiva la acetil-CoA carboxilasa, enzima que cataliza la síntesis del malonil-CoA en el hígado. El resultado es mayor transporte de ácidos grasos a las mitocondrias, y mayor flujo por la ruta de la β-oxidación. Las altas concentraciones de la acetil-CoA y del NADH que se producen en la oxidación de los ácidos grasos hacen bajar la oxidación de la glucosa y del piruvato, al inhibir el complejo de la piruvato deshidrogenasa. Así, no sólo se regulan recíprocamente la oxidación y el almacenamiento de los ácidos grasos, sino también se regula el metabolismo de los ácidos grasos, para que se favorezca el almacenamiento en tiempos de plenitud (como inmediatamente después de los alimentos) y la oxidación de los ácidos grasos procede cuando debe ahorrarse glucosa.

El citrato, precursor de la acetil-CoA citosólica, activa *in vitro* a la acetil-CoA carboxilasa, pero la importancia fisiológica de esta activación no se ha establecido por completo. La acetil-CoA carboxilasa se inhibe por el acil-CoA graso. La capacidad que tienen los derivados de los ácidos grasos para regular la acetil-CoA carboxilasa es adecuada fisiológicamente; una mayor concentración de los ácidos grasos causa una disminución de la rapidez del primer paso comprometido de la síntesis de los mismos. La actividad de la acetil-CoA carboxilasa también está bajo control hormonal. El glucagon estimula la fosforilación y la inactivación concomitante de la enzima en el hígado, y la epinefrina estimula su inactivación por fosforilación en los adipocitos. Varias proteínas cinasas pueden catalizar la fosforilación e inhibición consiguiente de la acetil-CoA carboxilasa. La acción de la proteína cinasa activada por AMP inactiva tanto la síntesis de los ácidos grasos (inhibiendo el paso de la acetil-CoA carboxilasa) como la síntesis de los esteroides en presencia de una alta relación de AMP/ATP.

16.10 Absorción y movilización de los lípidos combustibles en los mamíferos

Los ácidos grasos y el glicerol que los mamíferos usan como combustibles metabólicos se obtienen de los triacilgliceroles de la dieta y de los adipocitos. Las grasas almacenadas en los adipocitos comprenden las que se sintetizan en el catabolismo de los carbohidratos y los aminoácidos. Los ácidos grasos libres sólo existen en cantidades traza en las células; eso es afortunado, pues como aniones, son detergentes, y en grandes concentraciones podrían alterar las membranas celulares. Ahora se examinará la absorción, transporte y movilización de los ácidos grasos procedentes de la dieta en los mamíferos.

A. Absorción de los lípidos de la dieta

La mayor parte de los lípidos en la dieta de los mamíferos son triacilgliceroles con menores cantidades de fosfolípidos y colesterol. La digestión de los lípidos en la dieta ocurre principalmente en el intestino delgado, donde las partículas suspendidas de grasa se recubren con sales biliares (figura 16.25). Las sales biliares son derivados anfipáticos de colesterol, sintetizados en el hígado, recolectados en la vesícula biliar y secretados a la luz del intestino. La lipasa pancreática actúa degradando los triacilgliceroles en las partículas de grasa. Esta lipasa cataliza la hidrólisis en las posiciones del C-1 y del C-3 de un triacilglicerol, produciendo ácidos grasos libres y un 2-monoacilglicerol (figura 16.26). Una proteína pequeña, llamada colipasa, ayuda a enlazar a la lipasa, soluble en agua, con

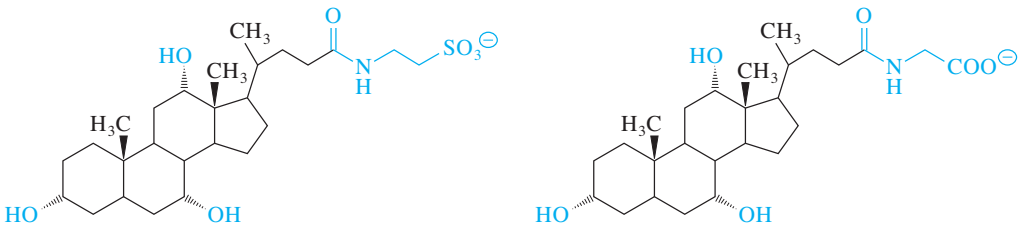
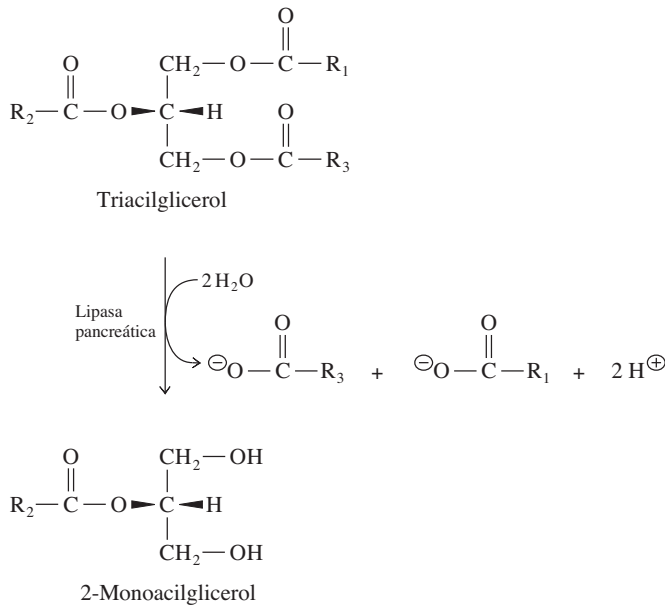


Figura 16.25 ▲
Sales biliares. Los derivados de colesterol, taurocolato y glicocolato son las sales biliares más abundantes en los humanos. Las sales biliares son anfipáticas: las partes hidrofílicas se muestran en gris y las partes hidrofóbicas están en negro.



◀Figura 16.26
Acción de la lipasa pancreática. La eliminación de las cadenas de acilo en el C-1 y C-3 produce ácidos grasos libres y un 2-monoacilglicerol. No se muestran los compuestos intermedios 1,2- y 2,3-diacilglicerol.

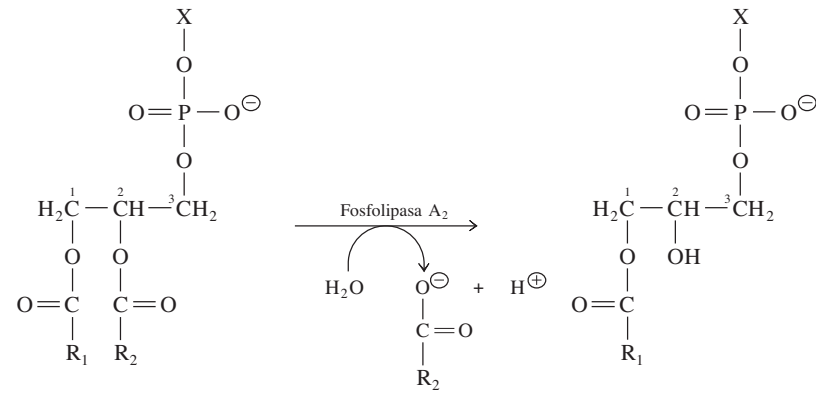


Figura 16.27 ▶
Acción de la fosfolipasa A_2. X representa un grupo de cabeza polar. R_1 y R_2 son largas cadenas hidrofóbicas que forman gran parte de la molécula de fosfolípido.

los sustratos lípidos. La colipasa activa también a la lipasa, manteniéndola en una conformación con un sitio activo abierto. Los ácidos grasos derivados de los triacilgliceroles en la dieta son principalmente moléculas de cadena larga.

Las sales biliares tienen una función importante en la absorción de los lípidos en la dieta. Los productos iniciales de la hidrólisis de las grasas son los ácidos grasos libres y los monoacilgliceroles. Esas moléculas son transportadas a la pared intestinal en micelas de sales biliares, donde se absorben en las células que recubren la pared intestinal y se liberan las sales biliares. La mayor parte de esas sales biliares recirculan por las partes inferiores del intestino delgado, la vena porta hepática y después al hígado. Las sales biliares circulan varias veces por el hígado y el intestino, durante la digestión de un solo alimento. Los ácidos grasos son convertidos a moléculas de acil-CoA graso dentro de las células intestinales. Tres de esas moléculas se pueden combinar con glicerina, o dos con un monoacilglicerol para formar un triacilglicerol. Según se describirá más adelante, esos triglicéridos insolubles en agua se combinan con el colesterol y con proteínas específicas para formar quilomicrones, para su transporte a otros tejidos.

El destino de los fosfolípidos en la dieta es parecido al de los triacilgliceroles. Las fosfolipasas pancreáticas secretadas al intestino catalizan la hidrólisis de los fosfolípidos (figura 9.8), que se agregan y forman micelas. La fosfolipasa principal en la secreción pancreática es la fosfolipasa A_2, que cataliza la hidrólisis del enlace de éster en el C-2 de un glicerofosfolípido, y forma un lisofosfoglicérido y un ácido graso (figura 16.27). En la figura 16.28 se ve un modelo de la fosfolipasa A_2 con un sustrato lipídico. Los lisofosfoglicéridos son absorbidos por el intestino y vueltos a esterificar para formar glicerofosfolípidos en las células intestinales.

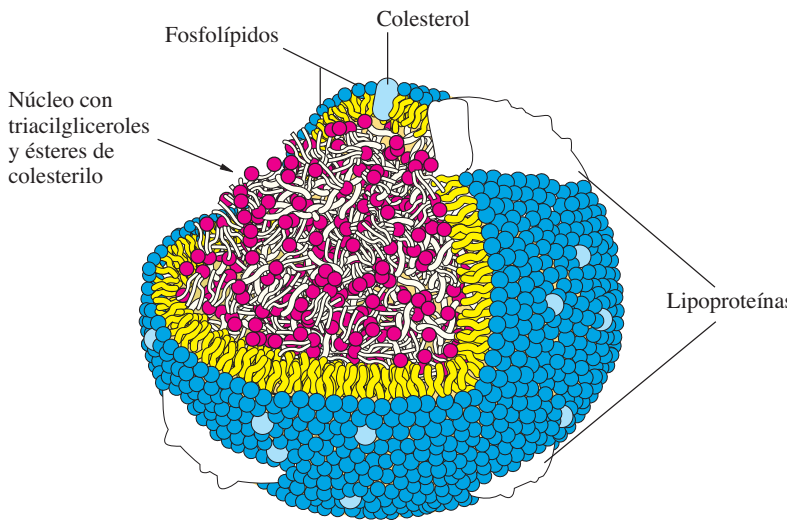
Normalmente, los lisofosfoglicéridos están presentes en las células sólo en bajas concentraciones. Las concentraciones altas pueden romper las membranas celulares, al actuar como detergentes. Esto sucede, por ejemplo, cuando la fosfolipasa A_2 en el veneno de las víboras actúa sobre los fosfolípidos en los glóbulos rojos, causando la lisis de sus membranas.

A diferencia de otros tipos de lípidos en la dieta, la mayor parte del colesterol en la dieta no está esterificado. Los ésteres de colesterilo en la dieta se hidrolizan en el lumen del intestino por acción de una esterasa. El colesterol libre, que es insoluble en agua, se solubiliza por las micelas de sales biliares para su absorción. La mayor parte del colesterol reacciona con la acil-CoA para formar ésteres de colesterilo (figura 9.16) en las células intestinales.

Figura 16.28 ▲
Estructura de la fosfolipasa A_2 procedente de veneno de cobra. La fosfolipasa A_2 cataliza la hidrólisis de los fosfolípidos en la interfase lípido-agua. El modelo muestra cómo un sustrato de fosfolípido (dimiristoíl fosfatidiletanolamina, modelo volumétrico) se puede ajustar en el sitio activo de la enzima hidrosoluble. Es probable que un ion de calcio (en gris) en el sitio activo ayude a enlazar al grupo aniónico de la cabeza. Más o menos la mitad de la parte hidrofóbica del lípido quedaría enterrada en el agregado lipídico. Las fosfolipasas en los mamíferos se parecen estructuralmente a la enzima del veneno. [PDB 1POB].

B. Lipoproteínas

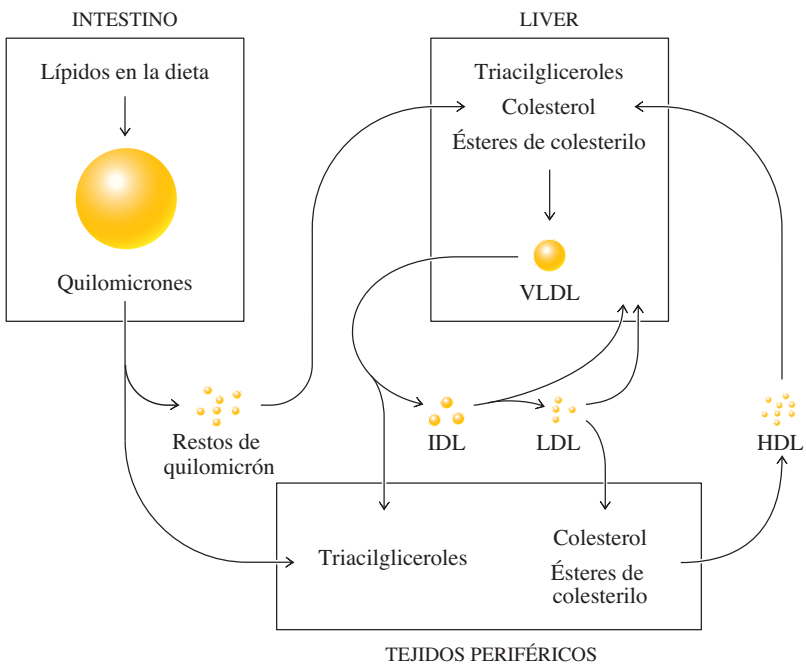
Los triacilgliceroles, el colesterol y los ésteres de colesterilo no se pueden transportar como moléculas libres en la sangre o en la linfa, porque son insolubles en agua. En vez de ello, esos lípidos se ensamblan con fosfolípidos y proteínas de unión anfipática a lípidos, y forman partículas macromoleculares esféricas, llamadas lipoproteínas. Una lipoproteína tiene un interior hidrofóbico que contiene triacilgliceroles y ésteres de colesterilo, y una superficie hidrofílica formada por una capa de moléculas anfipáticas, como colesterol, fosfolípidos y proteínas (figura 16.29).



◀Figura 16.29
Estructura de una lipoproteína. Un núcleo de lípidos neutros, incluyendo los triacilgliceroles y los ésteres de colesterilo, se recubre con fosfolípidos donde están embebidas a apolipoproteínas y colesterol.

Las lipoproteínas más grandes son los quilomicrones, que llevan triacilgliceroles y colesterol desde el intestino, por la linfa y la sangre, hasta los tejidos como el muscular (para la oxidación) y el adiposo (para almacenamiento) (figura 16.30). Los quilomicrones están presentes en la sangre sólo después de un alimento. Los restos de quilomicrones, ricos en colesterol y que han perdido la mayor parte de su triacilglicerol, llevan al colesterol al hígado. Las células hepáticas son responsables de sintetizar la mayor parte del colesterol recién sintetizado que entra al torrente sanguíneo, pero casi todos los tipos celulares pueden fabricar colesterol para uso interno. Las lipoproteínas llevan el colesterol, tanto de la dieta como del hígado, al resto de las células del organismo. La biosíntesis del colesterol es regulada por hormonas, y por las concentraciones de colesterol en la sangre.

El plasma sanguíneo contiene diversos tipos de lipoproteínas. Se clasifican de acuerdo con sus densidades relativas y tipos de lípido (tabla 16.1, página siguiente). Como las proteínas son más densas que los lípidos, cuanto mayor sea el contenido de proteína en una lipoproteína, mayor será su densidad. Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, *very-low density lipoprotein*) consisten en 98% de lípido y sólo 2%



◀Figura 16.30
Resumen del metabolismo de lipoproteína. Los quilomicrones formados en las células intestinales llevan los triacilgliceroles de la dieta a tejidos periféricos, incluyendo tejido muscular y adiposo. Los restos de los quilomicrones entregan ésteres de colesterilo al hígado. Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) se ensamblan en el hígado y llevan lípidos endógenos a los tejidos periféricos. Cuando se degradan las VLDL (por vía de lipoproteínas de densidad intermedia, IDL), toman colesterol y ésteres de colesterilo de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y se transforman en LDL, que llevan el colesterol a tejidos no hepáticos. Las HDL liberan colesterol desde los tejidos periféricos hasta el hígado.

TABLA 16.1 Lipoproteínas en el plasma humano

	Quilomicrones	VLDL	IDL	LDL	HDL
Peso molecular $\times 10^{-6}$	>400	10–80	5–10	2.3	0.18–0.36
Densidad (g cm^{-3})	<0.95	0.95–1.006	1.006–1.019	1.019–1.063	1.063–1.210
Composición química (%)					
Proteínas	2	10	18	25	33
Triacilgliceroles	85	50	31	10	8
Colesterol	4	22	29	45	30
Fosfolípidos	9	18	22	20	29

de proteína, aproximadamente. Las lipoproteínas de muy baja densidad se forman en el hígado, y llevan lípidos sintetizados en el hígado, o que no se necesitan en éste, a otros tejidos, como el adiposo. Las lipasas dentro de los capilares de tejidos musculares y adiposos degradan a las VLDL y a los quilomicrones. Cuando las VLDL ceden triacilgliceroles a las células de los tejidos, baja su contenido de lípido y sus restos se degradan a lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, *intermediate-density lipoprotein*). De las IDL formadas durante la descomposición de las VLDL, algunas son absorbidas por el hígado, y otras se degradan a lipoproteínas de baja densidad (LDL, *low-density lipoprotein*). Las LDL están enriquecidas en ésteres de colesterol y colesterilo, y llevan a esos lípidos a los tejidos periféricos. En el hígado se forman las lipoproteínas de alta densidad (HDL, *high-density lipoprotein*) como partículas ricas de proteínas. Toman colesterol de los tejidos periféricos, quilomicrones y ésteres de colesterilo, para regresarlos al hígado. Las IDL pueden tomar los ésteres de colesterilo de las IDL, que entonces se transforman en LDL.

Las partículas grandes de lipoproteína contienen varias proteínas distintas que se unen a lípidos. Se les llama con frecuencia apolipoproteínas, y el prefijo "apo-" suele indicar polipéptidos que se unen a un cofactor fuertemente asociado, como se describe en el capítulo 7. Dos de esas apolipoproteínas son proteínas grandes, hidrofóbicas y monómeras. La apoB-100 (M_r 513 000) está firmemente unida a la capa externa de las VLDL, IDL y LDL. Las apolipoproteínas más pequeñas de las VLDL e IDL están débilmente unidas, y la mayor parte se disocian durante la degradación de la lipoproteína dejando apoB-100 como principal componente proteínico de las LDL. La apoB-48 (M_r = 241 000), presente sólo en los quilomicrones, es idéntica, en estructura primaria, a 48% N-terminal de la apoB-100. Tanto la apoB-100 como la apoB-48 forman gran parte de la costra o capa sobre el interior hidrofóbico de sus respectivas lipoproteínas. La apoB-100 es la proteína que enlaza a las LDL en todo su receptor de superficie celular; la apoB-48 carece de esta propiedad. Las demás apolipoproteínas son menores que la apoB-48. Tienen una diversidad de funciones, que incluyen modular la actividad de ciertas enzimas que intervienen en la movilización de lípidos y la interacción con receptores en la superficie celular.

Las LDL llevan al colesterol, componente esencial de las membranas celulares eucarióticas, a los tejidos periféricos. Las partículas de lipoproteína se unen al receptor de LDL en la superficie celular. Un complejo entre LDL y su receptor entra a la célula por endocitosis y se funde con un lisosoma. Las lipasas y las proteasas lisosómicas degradan a la LDL, liberando colesterol, que entonces se incorpora en las membranas celulares, o se almacena en forma de ésteres de colesterilo. Una abundancia de colesterol intracelular reprime la síntesis de una enzima clave en la biosíntesis del colesterol, y también inhibe la síntesis del receptor de LDL. Los individuos que carecen de receptores de LDL padecen hipercolesterolemia familiar, enfermedad donde el colesterol se acumula en la sangre y se deposita en la piel y las arterias. Esos pacientes mueren de enfermedades cardiacas en edad temprana.

Las HDL eliminan colesterol del plasma y de las células de tejidos no hepáticos, regresándolo al hígado. En la superficie del hígado se unen a un receptor llamado SR-B1, y transfieren colesterol y sus ésteres a las células hepáticas. Las partículas de HDL, ya

RECUADRO 16.5 Lipoproteína lipasa y enfermedad coronaria

La lipoproteína lipasa (sección 16.9) es la enzima que desprende de los ácidos grasos de los triacilgliceroles en las lipoproteínas. Juega un papel importante en la eliminación de los triacilgliceroles del plasma sanguíneo. Las concentraciones altas de los triacilgliceroles se asocian a enfermedades coronarias.

La población humana contiene algunas variantes (mutaciones) del gen de la lipoproteína lipasa (LPL). Algunas de ellas se asocian a menor actividad de la LPL. Un ejemplo es la variante D9N, donde un residuo de la asparagina sustituye al residuo normal del glutamato en la posición 9. Los individuos que portan esta variante tienen propensión a padecer enfermedades coronarias debido a la acumulación de las lipoproteínas con triacilgliceroles en el plasma sanguíneo.

En la variante S447X, un codón normal de la serina muta en un codón de paro (X) en la posición 447. El resultado es una proteína truncada que es más corta que la normal. Aproximadamente el 17% de la población tiene al menos una copia de este gen variante, y el 1% de la población es homocigota para esta variante. La enzima S447X es más activa que la natural, y eso da como resultado menores concentraciones del triacilglicerol en el plasma. Es menos probable que los varones (no las mujeres) que portan esta variante sufran ataques cardiacos. Es un ejemplo de un alelo benéfico que ha surgido en la población humana.

agotado su lípido, regresan al plasma. En el hígado, el colesterol se puede convertir en sales biliares, que se segregan en la vesícula biliar.

La acumulación de depósitos de los lípidos en las arterias (aterosclerosis) se asocia a mayor riesgo de enfermedades coronarias que pueden llevar a un ataque cardiaco. Grandes concentraciones de LDL (colesterol "malo") *aumentan* la probabilidad de desarrollar aterosclerosis. Los altos niveles de HDL (colesterol "bueno"), por otra parte, se correlacionan con *menor* riesgo de padecer un ataque cardiaco. Las estatinas (recuadro 16.3) bloquean la síntesis del colesterol en el hígado y hacen bajar la concentración de LDL.

C. Albúmina de suero

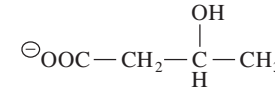
Además de los lípidos complejos como colesterol y triacilgliceroles, el plasma sanguíneo también transporta los ácidos grasos libres. Estos ácidos se unen a la albúmina de suero, una proteína plasmática abundante. Esta proteína, en especial la versión bovino (albúmina de suero de bovino, BSA o *bovine serum albumin*) se ha estudiado mucho durante más de 40 años. En fecha reciente se resolvió la estructura de la albúmina de suero humano (HSA, *human serum albumin*) mediante cristalografía de rayos X, en asociación con los ácidos grasos libres de diversas longitudes de cadena (figura 16.31).

La albúmina de suero humano pertenece a la categoría de estructuras terciarias todo-α (sección 4.7, figura 4.24a). Hay siete sitios de enlace distintos para los ácidos grasos (16:0) y otros de cadena intermedia y larga. En la mayoría de los casos el extremo del carboxilato en los ácidos grasos interactúa con las cadenas laterales de los residuos de los aminoácidos básicos, y las colas de metileno entran en bolsas hidrofóbicas que pueden adaptarse a cadenas de 10 a 18 carbonos. La HSA también se une a muchos medicamentos importantes que sólo son poco solubles en agua.

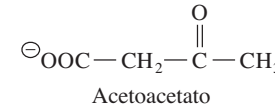
Figura 16.31 ▲
Albúmina de suero humano. Se muestran siete moléculas enlazadas de palmitato. [PDB 1E7H]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

16.11 Cuerpos cetónicos: moléculas de combustible

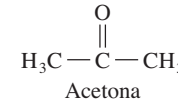
La mayor parte de la acetil-CoA producida en el hígado a partir de la oxidación de los ácidos grasos se envía al ciclo del ácido cítrico. Sin embargo, algo de ella puede ir por una ruta alterna. Durante periodos de ayuno, disminuye la glicólisis y la ruta de gluconeogénesis es activa. Bajo estas condiciones, la reserva de las moléculas de oxaloacetato se agota en forma temporal. La cantidad de acetil-CoA procedente de la β-oxidación supera a la capacidad del ciclo del ácido cítrico (recuérdese que el oxaloacetato reacciona con la acetil-CoA en el primer paso del ciclo del ácido cítrico). El exceso de acetil-CoA se usa para formar los cuerpos cetónicos: β-hidroxibutirato, acetoacetato y acetona. Como indican sus estructuras (figura 16.32), no todos los cuerpos cetónicos son cetonas. Los únicos cuerpos cetónicos importantes son el β-hidroxibutirato y el acetoacetato; la descarboxilación no enzimática del acetoacetato, un β-cetoácido, produce pequeñas cantidades de acetona.



β-Hidroxibutirato



Acetoacetato



Acetona

Figura 16.32 ▲
Cuerpos cetónicos.

Tanto el β-hidroxibutirato como el acetoacetato son moléculas de combustible. Tienen menos energía potencial metabólica que los ácidos grasos de donde se derivaron, pero compensan esta deficiencia sirviendo como "lípidos hidrosolubles" que se pueden transportar con más facilidad en el plasma sanguíneo. Durante la inanición, se producen grandes cantidades de cuerpos cetónicos, y se vuelven sustitutos de la glucosa como combustible principal para las células cerebrales. También los cuerpos cetónicos son metabolizados en el sistema musculoesquelético y en el intestino durante la inanición.

A. Síntesis de cuerpos cetónicos en el hígado

En los mamíferos, los cuerpos cetónicos se sintetizan en el hígado, y se exportan para usarlos en otros tejidos. La ruta de la síntesis de los cuerpos cetónicos se muestra en la figura 16.33. Primero se condensan dos moléculas de acetil-CoA par formar el acetoacetil-CoA y HS-CoA en una reacción catalizada por la acetoacetil-CoA tiolasa. Después, una tercera molécula de acetil-CoA se agrega a la acetoacetil-CoA para formar el 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) en una reacción catalizada por la HMG-CoA sintasa. Estos pasos son idénticos a los dos primeros pasos en la ruta de la biosíntesis del isopentenil difosfato (figura 16.15). Sin embargo, la síntesis de los cuerpos cetónicos se efectúa en las mitocondrias, y la del isopentenil disosfato (y del colesterol) se efectúa en el citosol. Los mamíferos tienen distintas isozimas de acetoacetil-CoA tiolasa y HMG-CoA sintasa

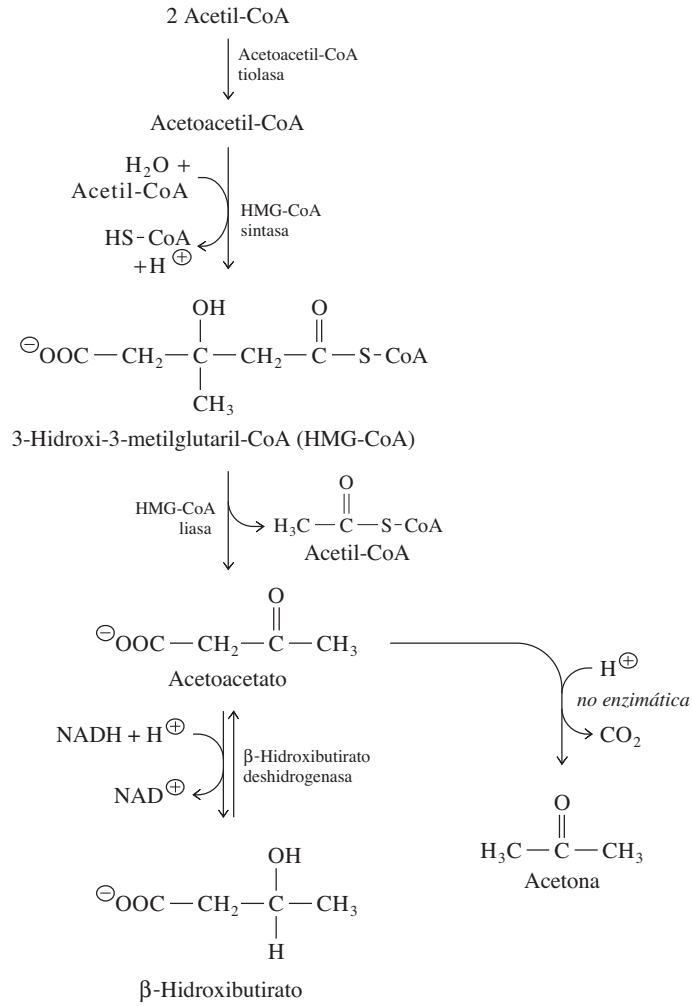


Figura 16.33 ▶
Biosíntesis del β-hidroxibutirato, acetoacetato y acetona.

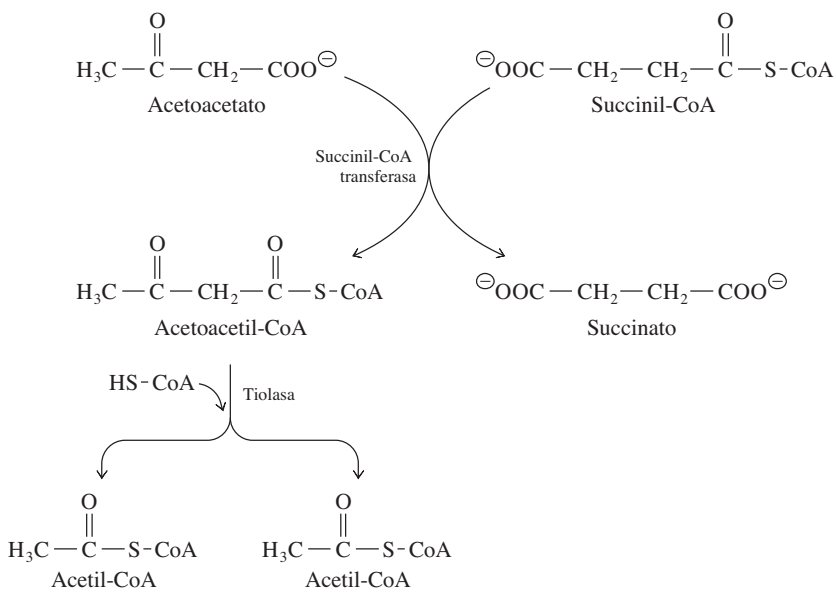
en las mitocondrias y en el citosol. La HMG-CoA sintasa sólo existe en las mitocondrias de las células hepáticas, y no en las de cualquier otra clase de células.

En el siguiente paso, la HMG-CoA liasa cataliza la ruptura del HMG-CoA y se produce el acetoacetato y la acetil-CoA. No hay HMG-CoA en el citosol, y es la razón de que la HMG-CoA se use exclusivamente en la síntesis del isopentenil difosfato y no se produzcan cuerpos cetónicos en el citosol. La reducción del acetoacetato, dependiente del NADH, produce el β-hidroxibutirato en una reacción catalizada por la β-hidroxibutirato deshidrogenasa. Tanto el acetoacetato como el β-hidroxibutirato se pueden transportar a través de la membrana mitocondrial interna y la membrana plasmática de las células hepáticas. Éstas entran a la sangre para que otras células del organismo las usen como combustible. Pequeñas cantidades del acetoacetato se descarboxila no enzimáticamente y forma acetona en el torrente sanguíneo.

El punto de control principal para la cetogénesis es la isozima mitocondrial de la HMG-CoA sintasa, siempre que estén disponibles la acil-CoA graso y la acetil-CoA en las mitocondrias. La succinil-CoA inhibe en forma específica a esta enzima por modificación covalente mediante succinilación. Es una desactivación corta, ya que con frecuencia hay reactivación por desuccinilación espontánea. El glucagon baja la cantidad del succinil-CoA en las mitocondrias, y eso estimula la cetogénesis. La regulación a largo plazo se efectúa por modificación de la expresión genética. La inanición hace aumentar la concentración de la HMG-CoA sintasa (y su ARNm); la realimentación o la insulina disminuye tanto de actividad como el ARNm.

B. Oxidación de los cuerpos cetónicos en las mitocondrias

En las células que los usan como fuente de energía, el β-hidroxibutirato y el acetoacetato entran a las mitocondrias, donde son convertidos en acetil-CoA, que se oxida en el ciclo del ácido cítrico. El β-hidroxibutirato se convierte en acetoacetato, en una reacción catalizada por una isozima de la β-hidroxibutirato deshidrogenasa, diferente de la enzima hepática. El acetoacetato reacciona con la succinil-CoA para formar acetoacetil-CoA en una reacción catalizada por la succinil-CoA transferasa (que también se llama succinil-CoA:3-cetoácido-CoA transferasa, figura 16.34). Los cuerpos cetónicos sólo se descomponen en los tejidos no hepáticos, porque esta transferasa existe en todos los tejidos excepto en el hígado. La reacción de la succinil-CoA transferasa "sifonea" algo de succinil-CoA del ciclo del ácido cítrico. La energía que normalmente se captaría como GTP en la fosforilación a nivel sustrato, catalizada por la succinil-CoA sintetasa (sección 13.3, parte 5),



◀Figura 16.34
Conversión del acetoacetato en acetil-CoA.

Los cambios en el metabolismo de los carbohidratos durante la inanición se describen en la sección 12.7.

se usa para formar su éster de CoA en vez de activar el acetoacetato. Entonces la tiolasa cataliza la conversión del acetoacetil-CoA en dos moléculas de acetil-CoA, que se pueden oxidar en el ciclo del ácido cítrico.

Este capítulo concluye con la descripción del metabolismo de los carbohidratos y de los lípidos. En seguida con el metabolismo de compuestos nitrogenados: aminoácidos y nucleótidos. Estos compuestos existen en las células, principalmente en forma de proteínas y polinucleótidos, respectivamente. Se verá que la síntesis e interconversión de muchos aminoácidos y nucleótidos consume considerable energía. En los dos capítulos que siguen se describirá la síntesis y el catabolismo de aminoácidos y de los nucleótidos.

RECUADRO 16.6 Metabolismo alterado de los carbohidratos y de los lípidos en la diabetes

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica debida a una mala regulación del metabolismo de los carbohidratos y de los lípidos. A pesar de tener una gran reserva de glucosa, el organismo se comporta como si estuviera consumiendo (en inanición) y se produce glucosa en exceso en el hígado que se subutiliza en otros tejidos. Entonces la concentración de glucosa en la sangre es extremadamente alta. Con frecuencia, las concentraciones de glucosa en la sangre superan la capacidad del riñón para absorberla, por lo que algo se elimina en la orina. La alta concentración de glucosa en la orina absorbe agua osmóticamente del organismo.

Hay dos tipos de diabetes, y ambos se deben al mal control del metabolismo de combustibles por la hormona insulina. La diabetes tipo I (llamada también diabetes mellitus insulinodependiente o IDDM, de *insulin-dependent diabetes mellitus*), causa daños a las células del páncreas, donde se sintetiza la insulina, y provoca secreción de insulina menor o nula. Esta enfermedad autoinmunitaria se caracteriza por un comienzo temprano (en general, antes de los 15 años). Los pacientes son delgados y tienen hiperglucemia (altas concentraciones de glucosa en la sangre), deshidratación, micción excesiva, hambre y sed. En el tipo 2 (llamado también diabetes no insulinodependiente o NIDDM), se produce hiperglucemia crónica por resistencia a la insulina: menor actividad de los receptores de insulina. Puede ser que la secreción de insulina sea normal e incluso que las concentraciones de insulina en la sangre sean elevadas. Este tipo también se conoce como diabetes de inicio en el adulto (aunque su incidencia va en aumento en los niños) y se suele asociar a la obesidad. La diabetes tipo 2 afecta al 5% de la población, y la tipo I al 1%. Además, alrededor de 2 a 5% de las mujeres embarazadas desarrollan una forma de diabetes. La mayoría de las mujeres que tienen diabetes gestacional regresan a la normalidad después del parto, pero tienen riesgo de desarrollar diabetes tipo 2.

Para comprender a la diabetes se deben tener en cuenta las funciones de la insulina. La insulina estimula la síntesis del glucógeno, triacilgliceroles y proteínas, e inhibe la descomposición de esas sustancias. La insulina también estimula el transporte de la glucosa a las células musculares y a los adipocitos. Cuando bajan las concentraciones de insulina en la IDDM, se descompone el glucógeno en el hígado y se efectúa la gluconeogénesis, independientemente del suministro de glucosa. Además se restringen la absorción de la glucosa y su uso en los tejidos periféricos. La descomposición de las grasas se debe a que no se inhibe la lipólisis por la insulina, y otras hormonas disparan la liberación de los ácidos grasos de los adipocitos. Las grandes cantidades de los ácidos grasos disponibles para el hígado causan exceso de la acetil-CoA, que se desvía y forma los cuerpos cetónicos. En la DM tipo 2, la acumulación de la glucosa en la sangre se debe principalmente a la mala absorción de la glucosa en los tejidos periféricos. Como la obesidad predispone a una persona a desarrollar la diabetes tipo 2, hay muchas investigaciones enfocadas al papel de los lípidos en la menor sensibilidad a la insulina. Al parecer, la abundancia de los ácidos grasos libres en la sangre puede interferir con la señalización, por parte de la insulina, de la absorción de la glucosa en los tejidos.

Las personas que padecen de DM tipo I no tratada producen grandes cantidades de cuerpos cetónicos, más que los que puede usar el tejido periférico. El olor de acetona se puede notar en el aliento de esos diabéticos. De hecho, las concentraciones del ácido acetoacético y del ácido β-hidroxibutírico en la sangre pueden ser tan altas que baje el pH del suero, condición potencialmente mortal llamada cetoacidosis diabética. La IDDM debe tratarse con inyecciones repetidas de insulina y con restricción de la glucosa.

Aunque las complicaciones agudas son raras en la DM tipo 2, la hiperglucemia puede causar daños a los tejidos, en especial en los ojos y en los sistemas cardiovascular y renal. Con frecuencia, bastan modificaciones dietéticas para controlar la DIDDM. Además, los medicamentos orales pueden incrementar la secreción de la insulina y potenciar su acción en los tejidos periféricos.

Un método novedoso para el tratamiento de la NIDDM puede ser la inhibición de la tirosina fosfatasa PTP-1B. Esta enzima inactiva al receptor de la insulina, catalizando la eliminación del fosfato agregado al receptor cuando la insulina se une a éste. Después de la inyección de la insulina, los ratones sin PTP-1B tienen mayor fosforilación del receptor de la insulina en el hígado y músculos, y mayor sensibilidad a la insulina. Esos ratones mantienen también concentraciones normales de la glucosa en la sangre después de un alimento. Una observación sorprendente fue que los ratones sin PTP-1B pudieron comer una dieta alta en grasas, pero sin aumentar de peso. Por consiguiente, la PTP-1B también puede ser un objetivo en el tratamiento de la obesidad.

Resumen

1. La ruta de la síntesis de ácidos grasos comienza con la síntesis del malonil-CoA en una reacción catalizada por la acetil-CoA carboxilasa. La malonil-CoA se convierte en malonil ACP y una molécula de malonil ACP se condensa con la acetil-CoA (o acetil ACP) para formar el acetoacetil ACP.
2. La formación de los ácidos grasos de cadena larga a partir del precursor 3-cetoacilo ACP se efectúa en cuatro etapas: reducción, deshidratación, más reducción y condensación. Estas cuatro etapas se repiten para formar un ácido graso de cadena larga. Los ácidos grasos con más de 18 carbonos, y los ácidos grasos no saturados, se producen con reacciones adicionales.
3. Los triacilgliceroles y los glicerofosfolípidos se derivan del fosfatidato. La síntesis de los triacilgliceroles y de los fosfolípidos neutros se efectúa a través de un 1,2-diacilglicerol intermedio. Los fosfolípidos ácidos se sintetizan a través de un CDP-diacilglicerol intermedio.
4. Muchos eicosanoides se derivan del araquidonato. La ruta de la ciclooxigenasa lleva a prostaciclina, prostaglandinas y troboxano A2. Entre los productos de la ruta de la lipooxigenasa están los leucotrienos.
5. Los esfingolípidos se sintetizan a partir de la serina y de la palmitoíl-CoA. Por reducción, acilación y oxidación se produce ceramida, que se puede modificar agregando un grupo de cabeza polar y residuos de azúcar.
6. El colesterol se sintetiza a partir de la acetil-CoA en una ruta que lleva a mevalonato y a isopentenil difosfato. Tanto el colesterol como el isopentenil difosfato son precursores de muchos otros compuestos.
7. Los ácidos grasos se degradan a acetil-CoA por la β-oxidación, la eliminación secuencial de fragmentos de dos carbonos. Primero se activan los ácidos grasos por esterificación a CoA, y el acil-CoA graso se oxida por una serie repetida de cuatro pasos catalizados por la enzima: oxidación, hidratación, más oxidación y tiólisis. Los ácidos grasos producen más ATP por gramo que la glucosa.
8. La β-oxidación de ácidos grasos de cadena impar produce la acetil-CoA y una molécula de propionil-CoA. La oxidación de la mayor parte de los ácidos grasos no saturados requiere dos enzimas, una isomerasa y una reductasa, además de las que se requieren para la oxidación de los ácidos grasos saturados.
9. La oxidación de ácidos grasos en los animales está regulada por hormonas, de acuerdo con las necesidades de energía del organismo.
10. La grasa de la dieta se hidroliza en el intestino, en ácidos grasos y monoacilgliceroles, y todos se absorben. Las lipoproteínas transportan lípidos en la sangre. En los adipocitos, los ácidos grasos se esterifican para su almacenamiento como triacilgliceroles. Los ácidos grasos se movilizan por acción de la lipasa, sensible a hormonas.
11. Los cuerpos cetónicos, el β-hidroxibutirato y el acetoacetato son moléculas hidrosolubles de combustible, que se producen en el hígado por condensación de moléculas de acetil-CoA.

Problemas

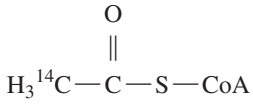
1. *a*) La hipercolesterolemia familiar es una enfermedad genética humana en la que los receptores de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) están defectuosos, lo que causa concentraciones muy altas de colesterol en la sangre y aterosclerosis grave a edad temprana. Explique por qué esta enfermedad causa altas concentraciones de colesterol en la sangre.
   b) Las altas concentraciones de colesterol en la sangre ¿afectan a la síntesis celular del colesterol en individuos con esta enfermedad?
   c) Las personas con la enfermedad de Tangier carecen de la proteína celular ABC1, que se necesita para la absorción del colesterol en las lipoproteínas de alta densidad (HDL). ¿Cómo afecta esta enfermedad al transporte del colesterol?
2. Las personas con concentraciones bajas de carnitina en sus músculos padecen debilidad muscular durante el ejercicio moderado. Además, sus músculos tienen mayores cantidades de triacilgliceroles.
   a) Explique estos dos defectos.
   b) ¿Pueden estas personas metabolizar aeróbicamente el glucógeno muscular?
3. ¿Cuántos equivalentes de ATP se generan en la oxidación completa de: *a*) laurato (dodecanoato) y *b*) palmitoleato (cis-Δ9-hexadecenoato)? Suponga que está funcionando el ciclo del ácido cítrico.
4. La tetrahidrolipstatina (Orlistat) es un medicamento para tratamiento de la obesidad. Es inhibidor de lipasa pancreática. Sugiera un uso racional de la tetrahidrolipstatina para tratar la obesidad.
5. Además de las enzimas de la β-oxidación, ¿cuáles enzimas son necesarias para degradar los siguientes ácidos grasos a acetil-CoA o acetil-CoA y succinil-CoA?
   a) Oleato (cis $CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7COO^{\ominus}$)
   b) Araquidonato (todo cis $CH_3(CH_2)_4(CH = CHCH_2)_4(CH_2)_2COO^{\ominus}$)
   c) cis $CH_3(CH_2)_9CH{=}CH(CH_2)_4COO^{\ominus}$
6. Los animales no pueden hacer una conversión neta de carbonos de ácidos grasos de cadena par a glucosa. Por otra parte,

algunos de los carbonos en los ácidos grasos de cadena impar pueden ser precursores de la glucosa en la gluconeogénesis. Explique.

7. ¿Dónde se encuentra el carbono marcado cuando se agregan las siguientes moléculas a un homogenizado de hígado que efectúa la síntesis de palmitato?

a) $H^{14}CO_3^{\ominus}$

b)



8. El triclosán (éter 2,4,4-tricloro-2-hidroxifenílico) es un antimicrobiano eficaz que se usa en una gran variedad de productos para el consumidor, como jabones, pasta dental, juguetes y tableros. El triclosán es eficaz contra un amplio espectro de bacterias y micobacterias, y es inhibidor de la FAS enoíl acilo proteína portadora reductasa tipo II.

a) ¿Cuál reacción es catalizada por la enoíl acilo proteína portadora reductasa?

b) ¿Por qué la enoíl acilo proteína portadora reductasa es un objetivo apropiado para los antimicrobianos?

c) Sugiera una razón por la que un compuesto puede inhibir selectivamente a la síntesis de los ácidos grasos en bacterias y no en humanos.

9. Se ha propuesto que el malonil-CoA puede ser una de las señales que van al cerebro para disminuir la respuesta del apetito. Cuando se administra a ratones un derivado de cerulenina (epóxido fungal), llamado C75, se suprime su apetito y pierden peso con rapidez. Se ha demostrado que la cerulenina y sus derivados son potentes inhibidores de la ácido graso sintasa (FAS). Sugiera cómo actuaría la C75 como medicamento potencial de reducción de peso.

10. *a*) Más o menos la mitad de los equivalentes reductores necesarios en la síntesis de los ácidos grasos se generan en la glucólisis. Explique cómo se pueden usar esos equivalentes reductores para la síntesis de ácidos grasos.

b) Trace una ruta general para convertir los carbohidratos en ácidos grasos en una célula hepática, e indique qué procesos suceden en el citosol y cuáles en las mitocondrias.

11. *a*) La acetil CoA carboxilasa (ACC) es un regulador clave de la síntesis de los ácidos grasos, y existe en dos formas diferentes, pero interconvertibles: 1) un polímero filamentoso activo (desfosforilado) y 2) una forma protomérica inactiva (fosforilada). El citrato y la palmitoíl CoA pueden regular la síntesis de los ácidos grasos uniéndose firmemente, de preferencia a distintas formas de ACC y estabilizándolas. Explique cómo funciona cada uno de esos reguladores al interactuar con ACC.

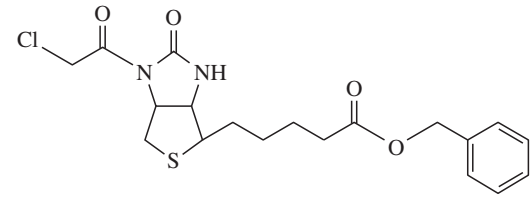
b) ¿Qué papel tienen el glucagon y la epinefrina en la regulación de síntesis de ácidos grasos?

12. La obesidad es un grave problema de salud a nivel mundial, que en parte se debe a mayor ingestión de alimentos y menor actividad física. La obesidad se asocia a diversas enfermedades humanas, incluyendo diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares. Se han propuesto inhibidores selectivos y específicos de la acetil-CoA carboxilasa como medicamentos potenciales contra la obesidad.

a) ¿Qué efecto tendría un inhibidor de la acetil-CoA carboxilasa sobre la síntesis y la oxidación de los ácidos grasos?

b) Uno de los inhibidores de la acetil-CoA carboxilasa es CABI (estructura adjunta). ¿Qué propiedad estructural de CABI lo hace inhibidor potencial de la acetil-CoA carboxilasa?

(Levert, K. L., Waldrop, G.L., Stephens, J. M. (2002). A biotin analog inhibits acetyl-CoA carboxylase activity and adipogenesis. J. *Biol. Chem.* 277:16347-16350.)



CABI

13. Escriba la ecuación de la conversión de 8 acetil-CoA en palmitato.

14. *a*) En respuesta a daño tisular, en lesiones como ataques cardiacos y artritis reumatoide, las células inflamatorias (como monocitos y neutrófilos) invaden al tejido lesionado y activan la síntesis del ácido araquidónico. Explique la razón de esta respuesta.

b) La biosíntesis de los eicosanoides es afectada por medicamentos no esteroideos como la hidrocortisona y la prednisona (que inhiben una fosfolipasa específica). ¿Por qué las medicinas esteroides inhiben la biosíntesis tanto de prostaglandinas como leucotrienos, en tanto que los medicamentos afines a la aspirina inhiben sólo la biosíntesis de las prostaglandinas?

15. Trace las estructuras correctas de los siguientes lípidos complejos.

a) Fosfatidil glicerol.

b) Etanolamina plasmalógeno (1-alquil-2-glicero-3-fosfoetanolamina).

c) Glucocerebrósido (1-β-D-glucoceramida).

16. El exceso de grasa en la dieta puede convertirse en colesterol en el hígado. Cuando se agrega palmitato marcado con 14C en cada carbono impar a un homogenizado de hígado, ¿dónde aparece(n) la(s) marca(s) en el mevalonato?

Lecturas seleccionadas

Generalidades

Mead, J. F., Alfin-Slater, R. B., Howton, D. R. y Popják, G. (1986). *Lipids: Chemistry, Biochemistry and Nutrition* (New York: Plenum). Un tratamiento reconocido sobre la estructura y el metabolismo de los lípidos.

Vance, D. E. y Vance, J. E., eds. (1991). *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (Amsterdam: Elsevier). Bien organizado y muy comprensible.

Síntesis de lípidos

Athenstaedt, K. y Daum, G. (1999). Phosphatidic acid, a key intermediate in lipid metabolism. *Eur. J. Biochem* 266:1-16. Describe las enzimas que intervienen en la biosíntesis de los triacilgliceroles y los glicerofosfolípidos.

Frye, L. L. y Leonard, D. A. (1999). Lanosterol analogs: dual-action inhibitors of cholesterol biosynthesis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 34:123-124. Los derivados de lanosterol inhiben tanto a la HMG-CoA reductasa como a una enzima que interviene en la conversión de lanosterol a colesterol.

Hardie, D. G. y Carling, D. (1997). The AMP-activated protein kinase. Fuel gauge of mammalian cells? *Eur. J. Biochem.* 246:259-273. Describe la regulación de la HMG-CoA reductasa y la acetil-CoA carboxilasa por varios mecanismos.

Jayakumar, A., Chirala, S. S. y Wakil, S. J. (1997). Human fatty acid synthase: assembling recombinant halves of the fatty acid synthase subunit protein reconstitues enzyme activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12326-12330. La ácido graso sintasa humana es modelo para las sintasas animales.

Kent, C. (1995). Eukaryotic phospholipid synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 315-343. Repaso de las principales rutas en mamíferos y levaduras.

Lu, Y-J., Zhang, Y-M., y Rock, C.O. (2004). **Product diversity and regulation of type II fatty acid synthesis**. *Biochem. Cell Biol.* 82:145-155.

Simmons, D. L., Botting, R. M. y Hla. T. (2004). Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol. Rev.* 56:387-437.

Sommerville, C., y Browse, J. (1996). Dissecting desaturation: plants prove advantageous. *Trends Cell. Biol.* 6:148-153.

Vance, J. E. (1998). Eukaryotic lipid-bios ynthetic enzymes: the same but not the same. *Trends Biochem. Sci.* 23:423-428. Las isozimas de enzimas biosintéticas tienen funciones específicas.

Wallis, J. G., Watts, J. L. y Browse, J. (2002). Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next? *Trends Biochem. Sci.* 27:467-473.

Catabolismo de lípidos

Bartlett, K. y Eaton, S. (2004). Mitochondrial β-oxidation. *Eur. J. Biochem.* 271:462-469.

Ishikawa, M., Tsuchiya, D., Oyama, T., Tsunaka, D. y Morikawa, K. (2004). Structural basis for channeling mechanisms of a fatty acid β-oxidation multienzyme complex. *EMBO J.* 23:2745-2754.

Kim, J-J. y Bataille, K. P. (2002). Burning fat: the structural basis of fatty acid β-oxidation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12:721-728.

Mannaerts, G. P., and Van Veldhoven, P. P. (1993). Metabolic pathways in mammalian peroxisomes. *Biochimie* 75:147-158.

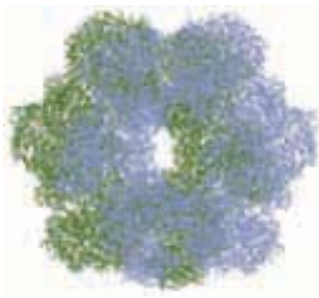
Lipoproteínas

Bhattacharya, A. A., Grüne, T. y Curry, S. (2000). Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin. *J. Mol. Biol.* 303:721-732.

Fidge, N. H. (1999). High density lipoprotein receptor, binding proteins and ligands. *J. Lipid Res.* 40: 187-201. Describe los papeles de los receptores de HDL.

Gagné, S. E., Larson, M. G., Pimstone, S. N., Schaefer, E. J. Kastelein, J. J. P., Wilson, P. W. F., Ordovas, J. M. y Hayden, M. R. (1999). A common truncation variant of lipoprotein lipase (S447X) confers protection against coronary heart disease: the Framingham Offspring Study. *Clin. Genet.* 55:450-454.

Kreiger, M. (1998). The "best" of cholesterols, the "worst" of cholesterols: a tale of two receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:4077-4080.Describe el enlazamiento de la LDL y de la HDL.



17

capítulo
diecisiete

Metabolismo de aminoácidos

Es una tarea casi imposible escribir un capítulo sobre metabolismo de aminoácidos. Toda descripción quedará incompleta, porque hay 20 aminoácidos diferentes, y muchos compuestos intermedios en las rutas de biosíntesis y degradación. Además, los diversos tejidos, organelos y organismos usan rutas alternas. Sin embargo, los aspectos metabólicos principales pueden indicar la lógica de la forma en que se forman y degradan los aminoácidos, desde el punto de vista biológico. Aquí se describirán varios de esos aspectos principales para ilustrar los principios del metabolismo de aminoácidos.

El metabolismo de aminoácidos comprende cientos de interconversiones enzimáticas de moléculas pequeñas. Muchas de esas reacciones implican átomos de nitrógeno. Algunos de los compuestos intermedios aparecen en las rutas metabólicas que se describieron en los capítulos anteriores, pero hay muchos que se mencionan aquí por primera vez. Aunque los aminoácidos de la degradación de las proteínas pueden ser una fuente de energía, aquí interesa más su biosíntesis. Si no estuvieran disponibles todos los aminoácidos a la vez para sintetizar proteínas, se pondría en riesgo la vida. Se puede describir el metabolismo de los 20 aminoácidos comunes desde dos puntos de vista: los orígenes y destinos de sus átomos de nitrógeno, y los orígenes y destinos de sus esqueletos de carbono.

La capacidad de los organismos para sintetizar aminoácidos varía mucho. Pocos organismos pueden asimilar N_2 y compuestos simples de carbono para formar aminoácidos, esto es, son totalmente autosuficientes en cuanto a proteínas. Otros pueden sintetizar las cadenas de carbono de los aminoácidos, pero requieren nitrógeno en forma de amoniaco. Este capítulo comienza con una descripción general de los principios del metabolismo del nitrógeno.

Algunas especies no pueden sintetizar los esqueletos de carbono de todos los aminoácidos. Por ejemplo, los mamíferos sólo pueden usar más o menos la mitad de los aminoácidos que requieren; el resto, que es el de los **aminoácidos esenciales**, lo deben obtener de su dieta. Los **aminoácidos no esenciales** son aquellos que pueden sintetizar los mamíferos en cantidad suficiente, siempre que reciban la proteína total en su dieta.

Arriba: Glutamina sintetasa de la bacteria *Salmonella typhimurium*. Doce subunidades idénticas se ordenan con simetría hexagonal. [PDB 2GLS]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

Las rutas de eliminación de desechos nitrogenados en el metabolismo de los aminoácidos también varían entre las especies. Por ejemplo, los animales acuáticos excretan el exceso de nitrógeno como amoniaco, las aves y la mayor parte de los reptiles como ácido úrico, y muchos otros vertebrados terrestres como urea. El capítulo termina con una descripción del ciclo de la urea, una ruta para eliminar nitrógeno en los mamíferos.

17.1 Ciclo del nitrógeno y fijación del nitrógeno

El nitrógeno necesario para los aminoácidos (y para las bases heterocíclicas de nucleótidos, capítulo 18) proviene de dos fuentes principales: nitrógeno gaseoso en la atmósfera y nitrato ($NO_3^{\ominus}$) en el suelo y el agua. El N_2 atmosférico, que forma 80% de la atmósfera, es la fuente original del nitrógeno biológico. Esta molécula puede ser metabolizada, o fijada, sólo por unas cuantas especies de bacterias. El N_2 y el ($NO_3^{\ominus}$) deben ser reducidos a amoniaco para ser usados en el metabolismo. El amoniaco producido se incorpora en los aminoácidos a través de glutamato, glutamina y carbamoíl fosfato.

El N_2 es químicamente inerte, por la gran fuerza del enlace N ≡ N. Algunas bacterias tienen una enzima muy específica y sofisticada, la nitrogenasa, que puede catalizar la reducción de N_2 a amoniaco en un proceso llamado **fijación de nitrógeno.** Además de la fijación del nitrógeno, hay dos procesos adicionales de conversión de nitrógeno. Durante las tormentas de rayos, las descargas de alto voltaje causan la oxidación de N_2 a nitrato y nitrito ($NO_2^{\ominus}$). En la industria, el nitrógeno se convierte en amoniaco para usarlo en fertilizantes vegetales mediante un proceso, costoso en energía, que requiere alta temperatura y presión, así como catalizadores especiales para impulsar la reducción de N_2 por H_2. La disponibilidad de nitrógeno biológicamente útil a menudo es limitante para el crecimiento de las plantas, y es importante la aplicación de fertilizadores nitrogenados para obtener altos rendimientos de los cultivos. Aunque sólo un pequeño porcentaje del nitrógeno que entra en el metabolismo proviene en forma directa de la fijación del nitrógeno, este proceso es la única forma para que los organismos puedan usar la gigantesca reserva de N_2 atmosférico.

El esquema general de interconversión de los principales compuestos nitrogenados se muestra en la figura 17.1. El flujo de nitrógeno desde N_2 hasta óxidos de nitrógeno, amoniaco y biomoléculas nitrogenadas, y de regreso a N_2, se llama **ciclo del nitrógeno**. La mayor parte del nitrógeno va y viene entre amoniaco y nitrato. El amoniaco procedente de organismos descompuestos es oxidado a nitrato por bacterias del suelo. Esta formación de nitrato se llama nitrificación. Algunas bacterias anaeróbicas pueden reducir

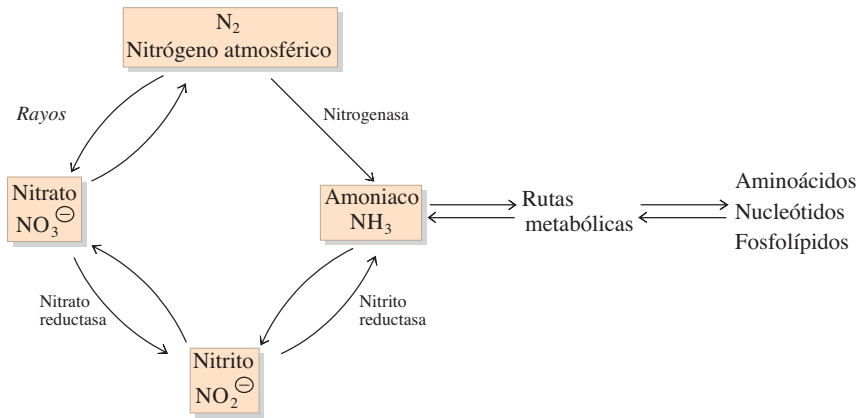


Figura 17.1 ▲
Ciclo del nitrógeno. Unos pocos microorganismos de vida libre o simbióticos son los que pueden convertir N_2 en amoniaco. El amoniaco se incorpora en biomoléculas como aminoácidos y proteínas, que después se degradan y vuelven a formar amoniaco. Muchas bacterias del suelo y plantas pueden hacer la reducción de nitrato a amoniaco pasando por nitrito. Varias bacterias convierten amoniaco en nitrito. Otras oxidan el nitrito a nitrato y algunas pueden reducir nitrato a N_2.

Figura 17.2 ▲
Nódulos en la raíz de una planta de trébol. Las bacterias simbióticas del género *Rhizobium* residen en estos nódulos, donde reducen el nitrógeno atmosférico a amoniaco.

nitratos o nitritos a N_2 (desnitrificación). La mayoría de las plantas verdes y algunos microorganismos contienen nitrato reductasa y nitrito reductasa, enzimas que en conjunto catalizan la reducción de óxidos de nitrógeno a amoniaco.

$$NO_3^{\ominus} \xrightarrow{2e^{\ominus},\,2H^{\oplus}\ \ H_2O} NO_2^{\ominus} \xrightarrow{6e^{\ominus},\,7H^{\oplus}\ \ 2H_2O} NH_3 \qquad \textbf{(17.1)}$$

Las plantas usan este amoniaco y suministran aminoácidos a los animales. La ferredoxina reducida (que se forma en las reacciones actínicas de la fotosíntesis, sección 15.2B) es la fuente del poder reductor en las plantas y en las bacterias fotosintéticas.

Se examinará la reducción enzimática del N_2. La mayor parte de la fijación del nitrógeno en la biosfera la efectúan bacterias que sintetizan la enzima nitrogenasa. Esta proteína de varias subunidades cataliza la conversión de cada molécula de N_2 en dos moléculas de NH_3. La nitrogenasa está presente en varias especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* que viven en simbiosis en los nódulos de raíces de muchas leguminosas, como soya, guisantes, alfalfa y trébol (figura 17.2). También el N_2 es fijado por bacterias de vida libre en el suelo, como *Agrobacteria, Azotobacter, Klebsiella* y *Clostridium*, y por las cianobacterias (principalmente *Trichodesmium spp.*) en el océano. La mayor parte de las plantas requieren una fuente de nitrógeno fijo de fuentes como tejidos animales y vegetales descompuestos, compuestos nitrogenados excretados por bacterias y fertilizantes. Los vertebrados obtienen nitrógeno fijado al ingerir materiales vegetales y animales.

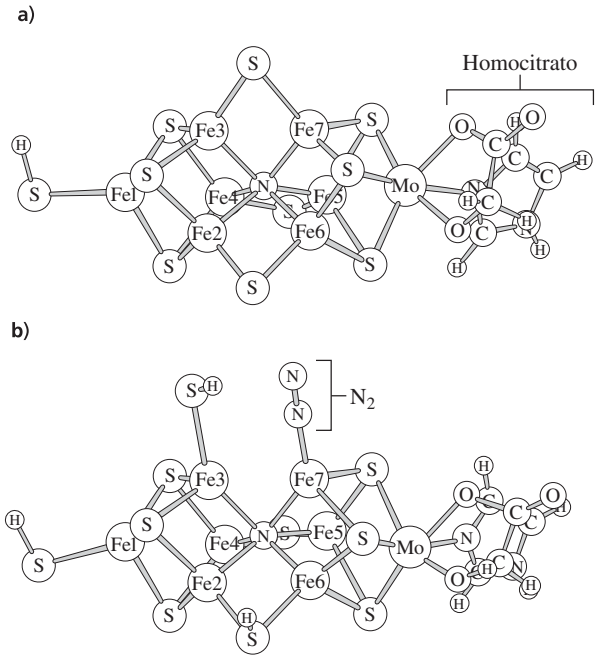
La nitrogenasa es un complejo proteínico formado por dos subunidades polipeptídicas diferentes, con un sistema de transporte de electrones relativamente complicado. Un polipéptido (llamado hierro proteína) contiene un grupo [4 Fe–4 S], y el otro (llamado molibdeno proteína) tiene dos centros de óxido-reducción, uno con hierro en un grupo [8 Fe–7 S] y el otro que contiene tanto hierro como molibdeno. Las nitrogenasas se deben proteger contra el oxígeno, porque las metaloproteínas son muy susceptibles a la inactivación por O_2. Por ejemplo, los anaerobios estrictos efectúan la fijación del nitrógeno sólo en ausencia de O_2. Dentro de los nódulos de las raíces en las leguminosas, la proteína leghemoglobina (homóloga de la mioglobina de los vertebrados, sección 4.12) se combina con el O_2 y con ello mantiene su concentración suficientemente baja en el ambiente inmediato de las enzimas fijadoras de nitrógeno de los rizobios. La fijación del nitrógeno en las cianobacterias se efectúa en celdas especializadas (heterocistos) cuyas gruesas membranas inhiben la entrada de O_2 (figura 10.8).

Se requiere un reductor enérgico, sea ferredoxina reducida o flavodoxina reducida (una flavoproteína portadora de electrones en los microorganismos) para la reducción enzimática de N_2 a NH_3. Una reducción obligatoria de 2 $H^{\oplus}$ a H_2 acompaña la reducción del N_2. Por cada electrón transferido por la nitrogenasa, deben convertirse al menos dos moléculas de ATP a ADP y P_i, así que la reducción de seis electrones, para una sola molécula de N_2 (más la reducción de dos electrones de 2 $H^{\oplus}$) consume un mínimo de 16 ATP.

$$N_2 + 8\,H^{\oplus} + 8\,e^{\ominus} + 16\ \text{ATP} \longrightarrow 2\,NH_3 + H_2 + 16\ \text{ADP} + 16\,P_i \qquad \textbf{(17.2)}$$

Para obtener el poder reductor y el ATP necesario para este proceso, los microorganismos simbióticos fijadores de nitrógeno consumen nutrientes obtenidos por la fotosíntesis efectuada por las plantas con las que se asocian.

La trayectoria del transporte de electrones, uno por uno, en la nitrogenasa va de la proteína coenzima reducida (por ejemplo, ferredoxina reducida) a la hierro proteína y después a la hierro-molibdeno proteína, donde se reduce el N_2. El ATP, que se enlaza a la hierro proteína, altera la conformación de ésta, de modo que se puede unir a la hierro-molibdeno proteína y formar una trayectoria efectiva para el transporte de electrones. En la transferencia de un electrón, se hidroliza el ATP enlazado, y la conformación de la hierro proteína se regresa a una forma que no se une a la hierro-molibdeno proteína. Por lo anterior, la hierro proteína funciona como transductor de señal, en forma muy parecida a la de una proteína G (sección 9.12A).



◀Figura 17.3
Estructura del centro reactivo $MoFe_7S_9N$ en *Azotobacter vinelandii*. **a)** Estado de reposo. **b)** Una estructura posible, con N_2 enlazado. [PDB 2MIN].

La reducción del nitrógeno se efectúa en el grupo hierro-molibdeno. Este grupo es de una complejidad notable. Consiste en una jaula de átomos de Fe y S, que rodean a un átomo central de N. Un solo átomo de Mo está unido a una orilla de la jaula Fe — S. Está quelado para formar una sola molécula de homocitrato, formando un grupo $MoFe_7S_9N$ • homocitrato (figura 17.3).

No obstante muchos años de intenso estudio, no se conoce el mecanismo detallado de la reacción de nitrogenasa. Es probable que cada uno de los tres enlaces N — N se rompa en forma sucesiva y origine los compuestos intermedios diimina e hidrazina.

$$\mathrm{N{\equiv}N} \xrightarrow{2e^{\ominus},\,2H^{\oplus}} \underset{\text{Diimina}}{\mathrm{H-N{=}N-H}} \xrightarrow{2e^{\ominus},\,2H^{\oplus}} \underset{\text{Hidrazina}}{\mathrm{H_2N-NH_2}} \xrightarrow{2e^{\ominus},\,2H^{\oplus}} \mathrm{NH_3 + NH_3} \qquad \textbf{(17.3)}$$

La reducción de $2H^{\oplus}$ a H_2, reacción acoplada esencial, consume el par adicional de electrones de la ferredoxina.

17.2 Asimilación del amoniaco

El amoniaco se asimila a una gran cantidad de metabolitos de bajo peso molecular, con frecuencia a través de los aminoácidos glutamato y glutamina. A pH 7, la principal forma iónica del amoniaco es ion amonio, $NH_4^{\oplus}$ ($pK_a = 9.2$). Sin embargo, el amoniaco no protonado (NH_3) es la especie reactiva en los centros catalíticos de muchas enzimas.

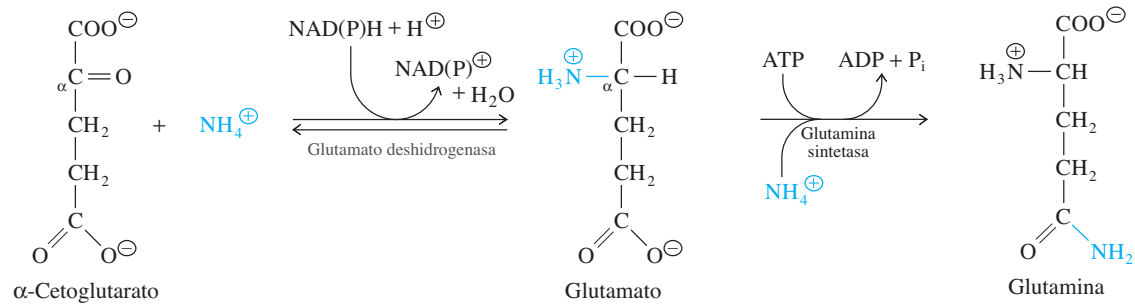


Figura 17.4 ▲
Incorporación de amoniaco en glutamato y glutamina.

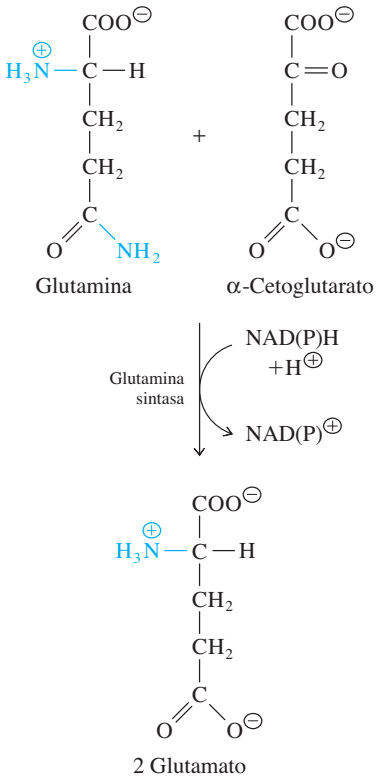


Figura 17.5 ▲
Catálisis de la aminación reductora de α-cetoglutarato por glutamato sintasa.

Las sintetasas son miembros de la clase ligasa de enzimas. Requieren ATP como cosustrato. Las sintasas son miembros de la clase liasa. Catalizan la adición de un sustrato a un doble enlace de un segundo sustrato (sección 5.1).

A. Incorporación de amoniaco a glutamato y glutamina

La aminación reductora de α-cetoglutarato a glutarato, por glutamato deshidrogenasa, es una ruta muy eficiente para incorporar amoniaco a las rutas centrales del metabolismo de aminoácidos (figura 17.4). Las glutamato deshidrogenasas de algunas especies o tejidos son específicas para NADH, y otras son específicas para NADPH. Otras más pueden usar cualquiera de esos cofactores.

La reacción de la glutamato deshidrogenasa puede tener distintas funciones fisiológicas, dependiendo de la disponibilidad de sustrato y coenzima, y de la especificidad de la enzima. En *Escherichia coli*, la enzima genera principalmente glutamato cuando hay $NH_4^{\oplus}$ en altas concentraciones. En el moho *Neurospora crassa*, se usa una enzima dependiente de NADPH para la aminación reductora del α-cetoglutarato a glutamato y la reacción inversa es catalizada por una enzima dependiente de $NAD^{\oplus}$. En los mamíferos y en las plantas, la glutamato deshidrogenasa está en las mitocondrias, y cataliza una reacción cercana al equilibrio con un flujo neto, en general de glutamato a α-cetoglutarato. El papel principal de la glutamato deshidrogenasa en los mamíferos es la degradación de aminoácidos y la producción de $NH_4^{\oplus}$. Es probable que los mamíferos asimilen muy poco nitrógeno como amoniaco libre. Obtienen la mayor parte de su nitrógeno en los aminoácidos y nucleótidos de su dieta.

Otra reacción crítica para la asimilación de amoniaco en muchos organismos es la formación de glutamina a partir de glutamato y $NH_4^{\oplus}$, catalizada por glutamina sintetasa (figura 17.4). La glutamina es donador de nitrógeno en muchas reacciones de biosíntesis. Por ejemplo, el nitrógeno de la amida de la glutamina es el precursor directo de varios de los átomos de nitrógeno de los sistemas de anillo de purina y pirimidina en los nucleótidos (secciones 18.1 y 18.3). En los mamíferos, la glutamina transporta el nitrógeno y el carbono entre los tejidos, evitando grandes concentraciones de $NH_4^{\oplus}$ tóxico en el torrente sanguíneo.

El nitrógeno de la amida de la glutamina puede ser transferido a α-cetoglutarato y producir dos moléculas de glutamato en una reacción de aminación reductora catalizada por glutamato sintasa (figura 17.5). Como la glutamato deshidrogenasa, la glutamato sintasa requiere un nucleótido reducido de piridina para aminar α-cetoglutarato en forma reductora. A diferencia de la deshidrogenasa, la sintasa usa glutamina como fuente de nitrógeno. Los animales no tienen glutamato sintasa.

B. Reacciones de transaminación

Se puede transferir el grupo amino del glutamato a muchos α-cetoácidos en reacciones catalizadas por unas enzimas llamadas transaminasas o aminotransferasas. La reacción general de transaminación se muestra en la figura 17.6.

El grupo amino del glutamato es transferido a diversos α-cetoácidos, generando los α-aminoácidos correspondiente durante su síntesis. La mayor parte de los aminoácidos

comunes se pueden formar por transaminación. En el catabolismo de aminoácidos se transfieren los grupos amino desde varios aminoácidos a α-cetoglutarato o a oxalacetato, y generan glutamato o aspartato.

Todas las transaminasas conocidas requieren la coenzima piridoxal fosfato (figura 17.7). El mecanismo químico de la semirreacción inicial de transaminación se mostró en la figura 7.18. La transaminación completa requiere dos semirreacciones acopladas, y la piridoxamina fosfato, unida a la enzima (PMP) lleva en forma provisional al grupo amino que está siendo transferido.

Las transaminasas catalizan reacciones cercanas al equilibrio. La dirección en la que avanzan las reacciones *in vivo* depende del suministro de sustratos y de la eliminación de los productos. Por ejemplo, en células con exceso de grupos nitrogenados de α-amino, los grupos amino se pueden transferir a α-cetoglutarato mediante una reacción de transaminación, o de una serie de ellas, para formar glutamato, que puede sufrir desaminación oxidante catalizada por glutamato deshidrogenasa. Cuando se forman activamente aminoácidos, la transaminación va en dirección contraria, y el glutamato dona los grupos amino.

Una alternativa importante de la reacción de glutamato deshidrogenasa en las bacterias consiste en reacciones acopladas catalizadas por glutamina sintetasa y glutamato sintasa, para asimilar el amoniaco en el glutamato, en especial cuando es baja la concentración de amoniaco. La figura 17.8 muestra la forma en que las acciones combinadas de la glutamina sintetasa y glutamato sintasa pueden causar la incorporación de amoniaco en diversos aminoácidos. La conversión de α-cetoglutarato en glutamato puede hacerse a través de la ruta glutamina sintetasa-glutamato sintasa a las bajas concentraciones de $NH_4^{\oplus}$ que hay en la mayor parte de las células bacterianas, porque la K_m de la glutamina sintetasa para $NH_4^{\oplus}$ es mucho menor que la de la glutamato deshidrogenasa para $NH_4^{\oplus}$.

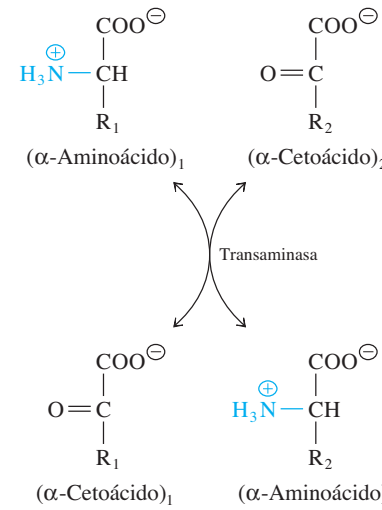
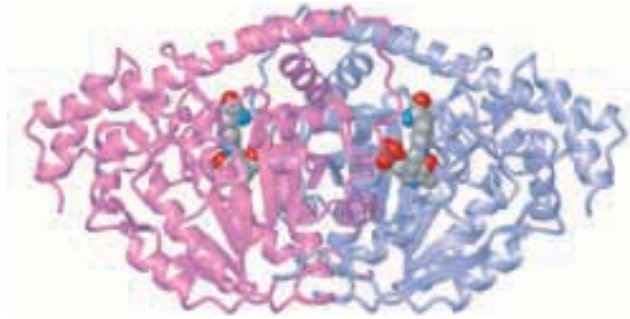


Figura 17.6 ▲
Transferencia de un grupo amino, de un α-aminoácido a un α-cetoácido, catalizada por una transaminasa. En las reacciones de biosíntesis, el aminoácido inicial es glutamato [= $(\alpha\text{-aminoácido})_1$]. En las reacciones de transaminación donde el glutamato es el grupo amino donador, el producto es α-cetoglutarato [= $(\alpha\text{-cetoácido})_1$]. El $(\alpha\text{-cetoácido})_2$ representa el precursor de un ácido, $(\alpha\text{-aminoácido})_2$, recién formado.



◀ Figura 17.7
Aspartato transaminasa citosólica del cerdo (*Sus scrofa*); es dímera con subunidades idénticas (los monómeros individuales están en púrpura y azul). Se muestra una molécula de la coenzima fosfato de piridoxal (modelo volumétrico) en cada sitio activo. [PDB 1AJR]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

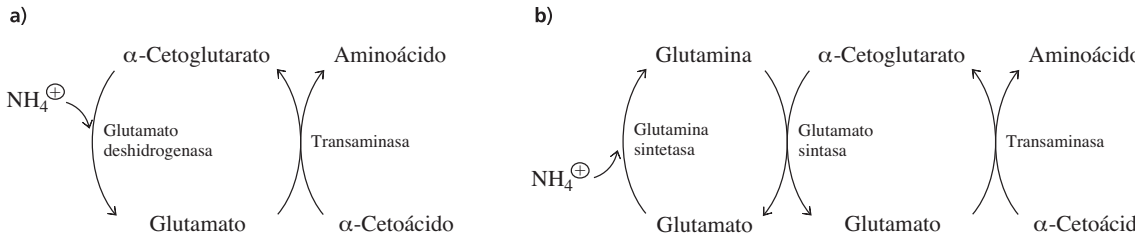


Figura 17.8 ▲
Asimilación de amoniaco en aminoácidos. **a)** Ruta de glutamato deshidrogenasa. **b)** Acción combinada de glutamina sintetasa y glutamato sintasa bajo condiciones de baja concentración de $NH_4^{\oplus}$.

17.3 Síntesis de aminoácidos

Ahora se describirán los orígenes de los esqueletos de carbono en los aminoácidos. La figura 17.9 muestra la forma en que se relacionan las rutas de biosíntesis para los 20 aminoácidos comunes con otras rutas metabólicas. Obsérvese que 11 de los 20 aminoácidos comunes son sintetizados a partir de compuestos intermedios en el ciclo del ácido cítrico. Los demás requieren precursores simples, que ya se han visto en capítulos anteriores.

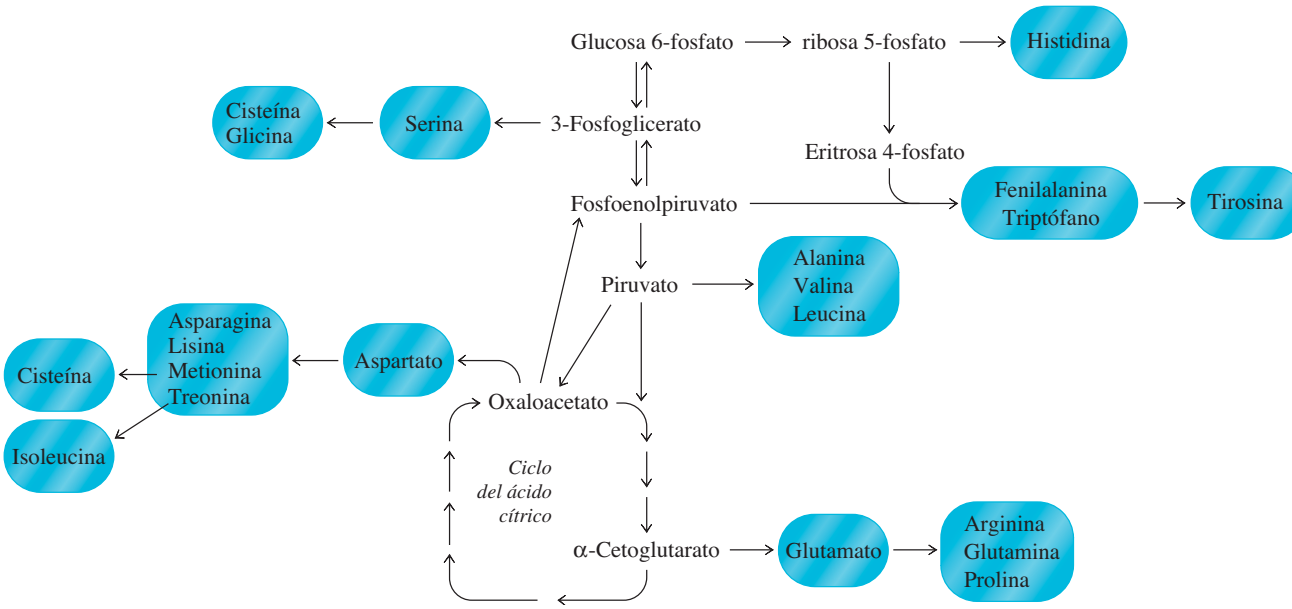


Figura 17.9 ▲
Biosíntesis de aminoácidos, mostrando las conexiones con glicólisis y gluconeogénesis, y el ciclo del ácido cítrico.

A. Aspartato y asparagina

El oxaloacetato es el grupo aceptor de amino en una reacción de transaminación que produce aspartato (figura 17.10). La enzima que cataliza esta reacción es aspartato transaminasa. En la mayor parte de las especies se sintetiza asparagina por una transferencia, dependiente de ATP, del nitrógeno de la amida en la glutamina al aspartato, en una reacción catalizada por asparagina sintetasa. En algunas bacterias, la asparagina sintetasa cataliza la formación de asparagina a partir de aspartato, con amoniaco en vez de glutamato

RECUADRO 17.1 Se puede tratar la leucemia linfoblástica infantil con asparaginasa

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es causada por proliferación de linfoblastos malignos de células T debido, en la mayoría de los casos, a una mutación causada por errores en una recombinación genética durante la activación de los genes receptores de células T. Los linfoblastos malignos tienen menores concentraciones de asparagina sintetasa, y no pueden sintetizar la suficiente asparagina para sostener su rápido crecimiento y proliferación. A diferencia de las células normales, deben obtener asparagina en el plasma sanguíneo.

Este cáncer se puede tratar con éxito con inyecciones de asparaginasa, enzima de *E. coli* que descompone la asparagina en el plasma (sección 17.6A). En ausencia de una fuente disponible de asparagina, mueren las células malignas. El tratamiento sólo con asparaginasa causa la remisión en 50% de los casos de LLA y el éxito aumenta todavía cuando se combina el tratamiento enzimático con otra quimioterapia. La causa principal de la resistencia al tratamiento se debe a mayor expresión de asparagina sintetasa en las células cancerosas.

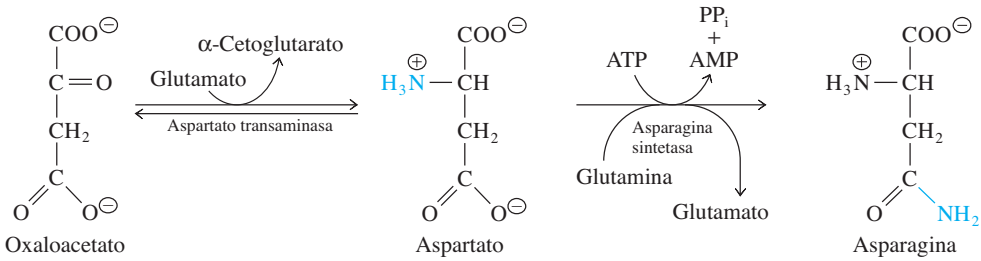


Figura 17.10 ▲
Síntesis de aspartato y asparagina.

como fuente del grupo amida. Esta reacción se parece a la catalizada por glutamina sintetasa.

En algunos casos, la misma asparagina sintetasa puede usar amoniaco o glutamato, en forma indistinta, como sustrato. Estas enzimas usan $NH_4^{\oplus}$ como sitio primario de reacción, pero tienen un segundo sitio que cataliza la hidrólisis de la glutamina y la liberación de $NH_4^{\oplus}$. El $NH_4^{\oplus}$ intermedio se difunde por un túnel en la proteína, que une a los dos sitios activos. Este ejemplo de canalización molecular asegura que la hidrólisis de la glutamina se acople en forma estrecha a la formación de asparagina, y evita la acumulación de $NH_4^{\oplus}$ en la célula. Hay muchos ejemplos de túneles moleculares que facilitan la canalización de $NH_4^{\oplus}$ (véase el recuadro 18.2).

B. Lisina, metionina y treonina

El aspartato es el precursor de lisina, metionina y treonina (figura 17.11). El primer paso en la ruta es la fosforilación de aspartato en una reacción catalizada por aspartato cinasa. En el segundo paso, se convierte fosfato de aspartilo en aspartato β-semialdehído.

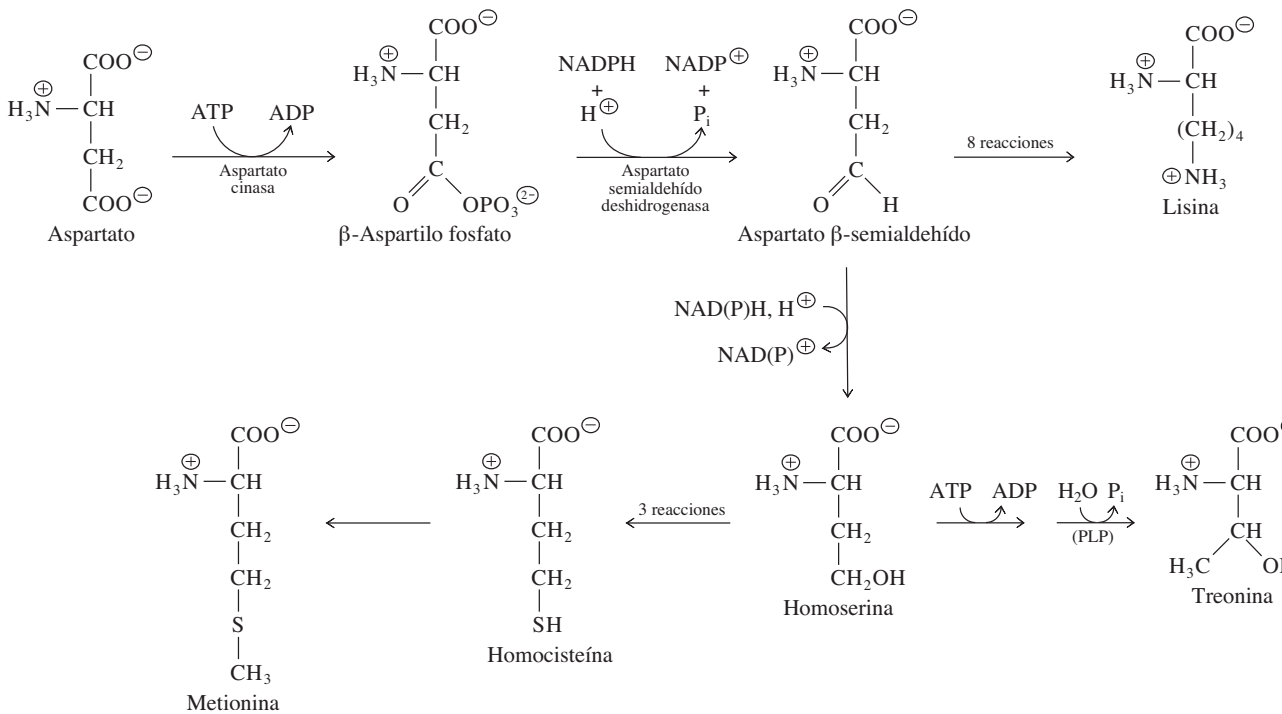


Figura 17.11 ▲
Biosíntesis de lisina, treonina y metionina a partir de aspartato.

La aspartato semialdehído deshidrogenasa es la que cataliza este paso. Estas dos enzimas están presentes en bacterias, protistas, hongos y plantas, pero no en los animales. En consecuencia, los animales no pueden sintetizar lisina, metionina ni treonina (véase el recuadro 17.3).

Las dos primeras reacciones de formación de aspartato β-semialdehído son comunes en la formación de los tres aminoácidos. En la rama que va a la lisina, la fuente de átomos de carbono agregados al aspartato β-semialdehído es el piruvato, y el glutamato es la fuente del grupo ε-amino. En las levaduras y en algunas algas, la lisina se produce en una ruta totalmente diferente, que comienza con α-cetoglutarato.

Se forma homoserina a partir de aspartato β-semialdehído. La treonina se deriva de la homoserina en dos pasos, y en uno de ellos se requiere PLP. En la ruta de la metionina, la homoserina se convierte en homocisteína en tres pasos. El átomo de azufre en la homocisteína acepta entonces un grupo metilo derivado de la metionina, formadora de 5-metiltetrahidrofolato. En los mamíferos hay una enzima que cataliza esta reacción, pero su actividad es baja y el abastecimiento de homocisteína es limitado. En consecuencia, la metionina sigue siendo un aminoácido esencial en los mamíferos, debido más que nada a la presencia de las dos primeras enzimas en la ruta.

C. Alanina, valina, leucina e isoleucina

El piruvato es el grupo amino aceptor en la síntesis de alanina por reacción de transaminación (figura 17.12). También el piruvato es precursor en la síntesis de los aminoácidos valina, leucina e isoleucina de cadena ramificada. El primer paso en la ruta de cadena ramificada es la síntesis de α-cetobutirato a partir de la treonina.

El piruvato se combina con α-cetobutirato en una serie de tres reacciones, que forman el compuesto intermedio de cadena ramificada α-ceto-β-metilvalerato. Este intermedio se convierte en isoleucina en una reacción de transminación. Nótese la semejanza entre las estructuras de α-cetobutirato y de piruvato. Las mismas enzimas que catalizan la síntesis de α-ceto-β-metilvalerato catalizan también la de α-cetoisovalerato, combinando dos moléculas de piruvato en vez de una de piruvato y una de α-cetobutirato. El α-cetoisovalerato se convierte, en forma directa, en valina, por la valina transaminasa, la misma enzima que cataliza la síntesis de isoleucina a partir de α-ceto-β-metilvalerato.

El esqueleto de carbonos del α-cetoisovalerato se alarga en un grupo metileno para formar leucina, en una ruta que se desvía de la ruta biosintética de la valina. Dos de las enzimas en esta ruta son homólogas a la aconitasa y la isocitrato deshidrogenasa en el ciclo del ácido cítrico, lo que parece respaldar la idea de que las enzimas del ácido cítrico evolucionaron a partir de enzimas preexistentes necesarias en la biosíntesis de aminoácidos (sección 13.8).

D. Glutamato, glutamina, arginina y prolina

Se ha visto cómo se forman el glutamato y la glutamina a partir del α-cetoglutarato, compuesto intermedio en el ciclo del ácido cítrico. Los átomos de carbono de la prolina y la arginina también pueden provenir del α-cetoglutarato, a través del glutamato. La prolina se sintetiza del glutamato por una ruta de cuatro pasos, donde se reduce el grupo γ-carboxilato del glutamato y forma un aldehído. El glutamato γ-semialdehído intermedio sufre ciclación no enzimática y forma una base de Schiff, un 5-carboxilato que se reduce por una coenzima de piridina nucleótido y produce prolina (figura 17.13, página 530).

En la mayor parte de los organismos, la ruta hacia la arginina se parece, pero el grupo α-amino del glutamato se acetila antes de formarse el aldehído. Este paso evita la ciclación que hay en la síntesis de la prolina. El *N*-acetilglutamato γ-semialdehído intermedio se convierte entonces en *N*-acetil ornitina, y en ornitina. En los mamíferos se transamina el glutamato γ-semialdehído y forma ornitina, la que se convierte en arginina por las reacciones del ciclo de la urea (sección 17.7).

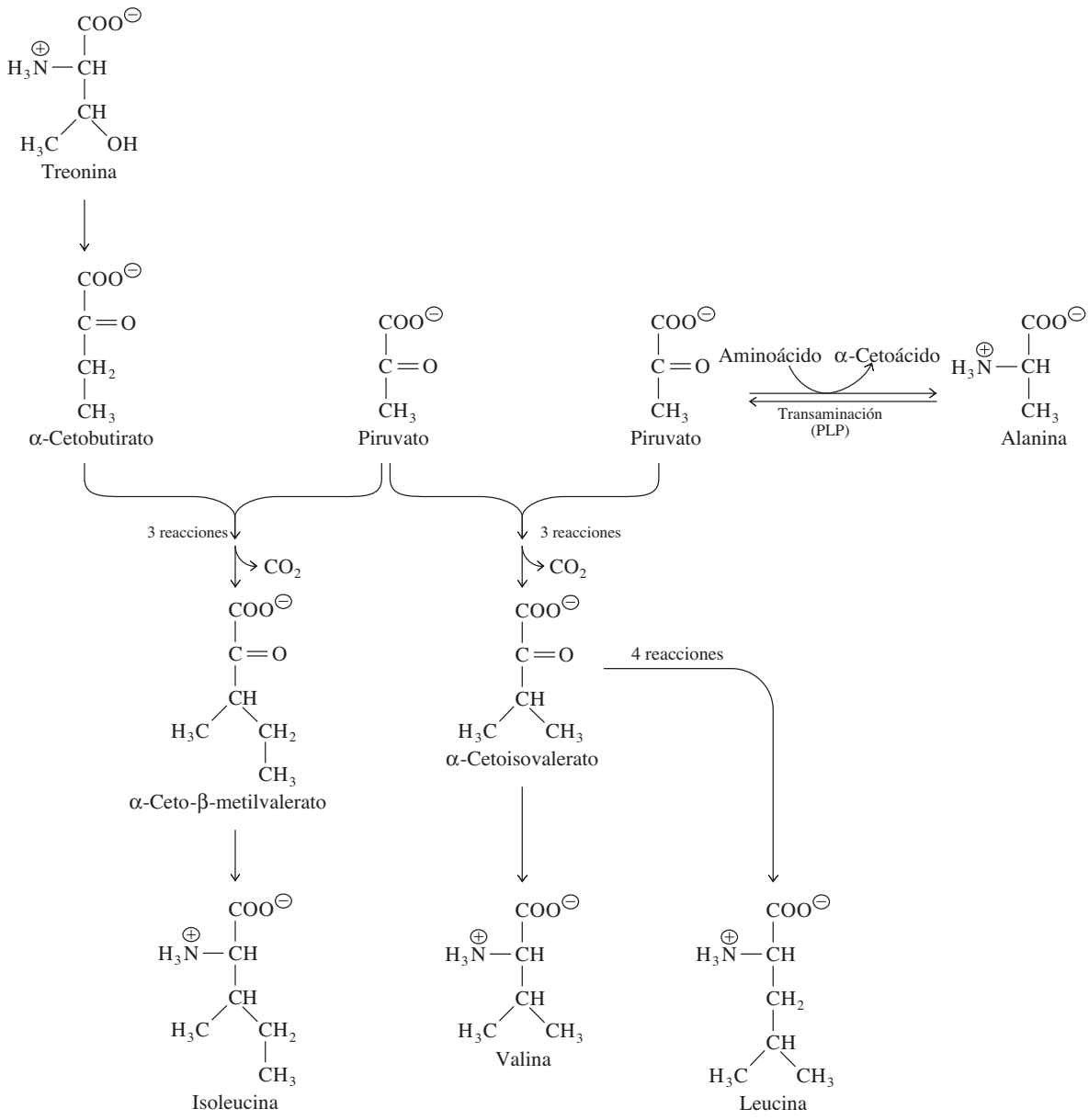


Figura 17.12 ▲
Biosíntesis de alanina, isoleucina, valina y leucina.

E. Serina, glicina y cisteína

Tres son los aminoácidos que se derivan del 3-fosfoglicerato (serina, glicina y cisteína), compuesto intermedio en la ruta de glucólisis y gluconeogénesis. La serina se sintetiza a partir del 3-fosfoglicerato en tres pasos (figura 17.14, página siguiente). Primero se oxida el sustituyente hidroxilo secundario del 3-fosfoglicerato a grupo ceto, formando 3-fosfohidroxipiruvato. Este compuesto sufre transaminación con glutamato y se forman 3-fosfoserina y α-cetoglutarato. Por último, la 3-fosfoserina se hidroliza y forma serina y P_i.

La serina es una fuente principal de glicina mediante una reacción reversible catalizada por serina hidroxmetiltransferasa (figura 17.15, página siguiente). En las mitocondrias vegetales y en las bacterias, el flujo por esta reacción es hacia la serina, y

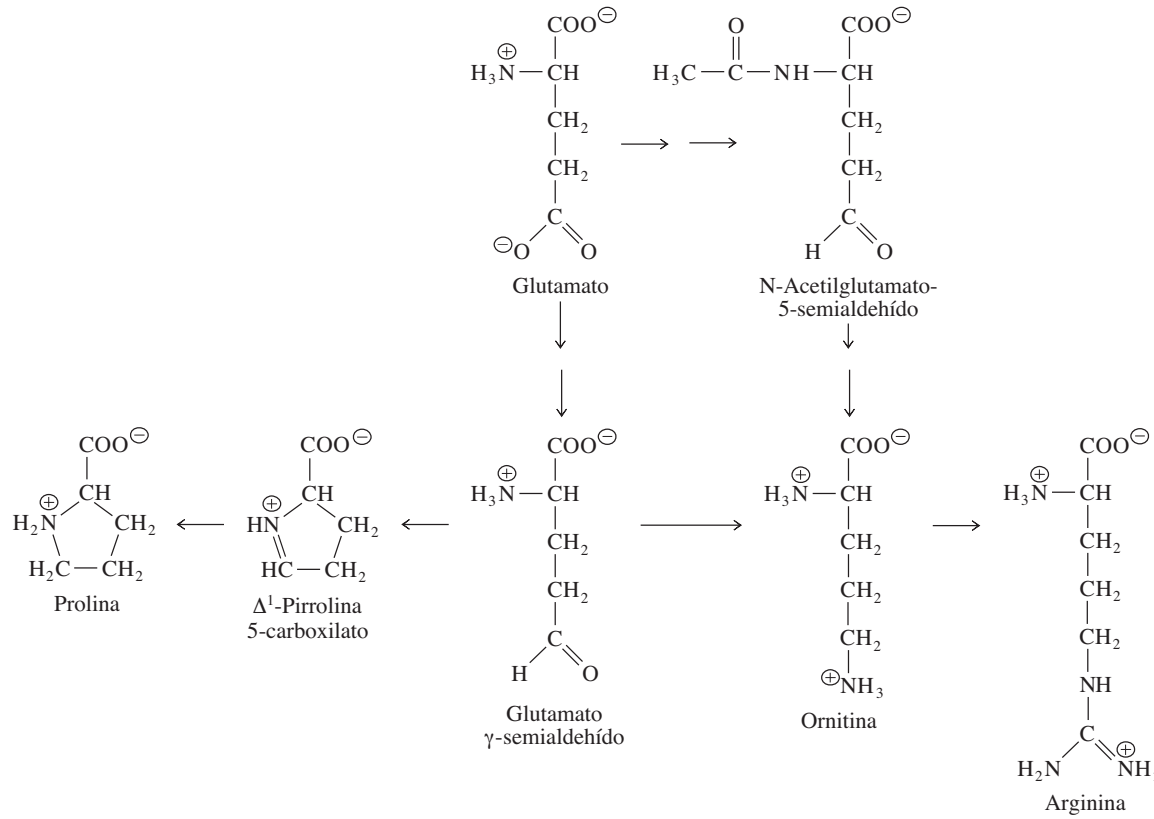


Figura 17.13 ▲
Conversión de glutamato a prolina y arginina.

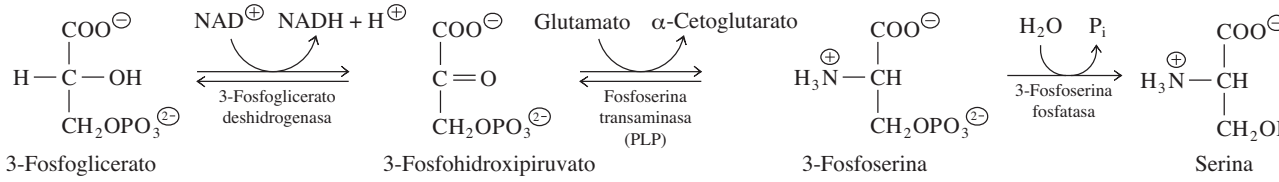


Figura 17.14 ▲
Biosíntesis de la serina.

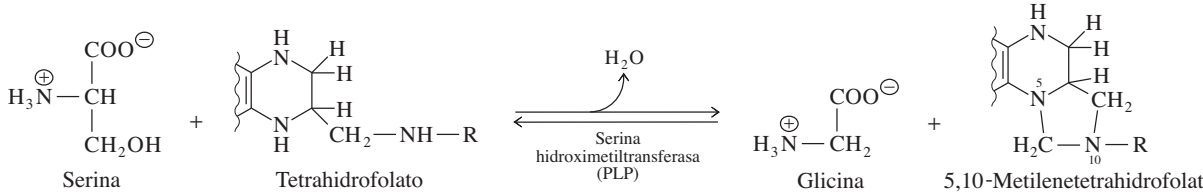


Figura 17.15 ▲
Biosíntesis de la glicina.

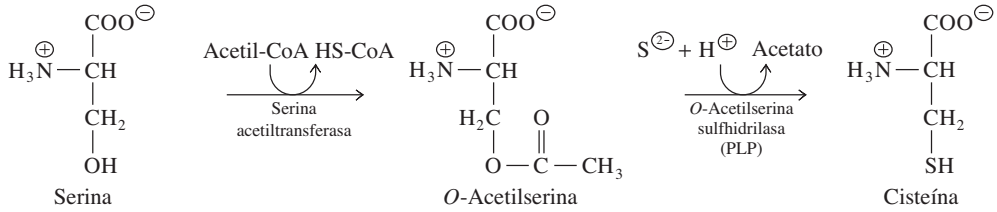
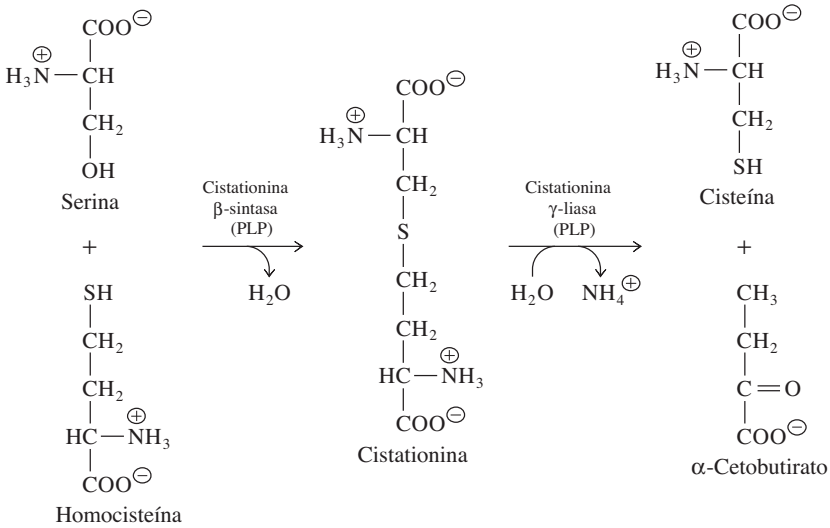


Figura 17.16 ▲
Biosíntesis de cisteína a partir de serina en muchas bacterias y plantas.

forma una ruta hacia la serina, diferente a la de la figura 17.14. En la reacción de serina hidroximetiltransferasa se requieren dos cofactores: el grupo prostético PLP (5′-fosfato de piridoxal) y el cosustrato tetrahidrofolato.

En la mayor parte de las especies, la biosíntesis de la cisteína a partir de la serina se efectúa en dos pasos (figura 17.16). Primero se transfiere un grupo acetilo de la acetil-CoA al sustituyente β-hidroxilo de la serina y se forma O-acetilserina. A continuación el sulfuro (S^{2-}) desplaza al grupo acetato para formar cisteína.

Los animales no cuentan con la ruta normal de biosíntesis de cisteína que se ve en la figura 17.16. Sin embargo la pueden sintetizar como subproducto de la degradación de la metionina (sección 17.6F). En el primer paso, la serina se condensa con homocisteína, compuesto intermedio en la biosíntesis de la metionina. El producto de la reacción de condensación es cistationina, y se rompe formando α-cetobutirato y cisteína (figura 17.17).



◀Figura 17.17
Biosíntesis de cisteína en los mamíferos.

F. Fenilalanina, tirosina y triptófano

La clave para aclarar la ruta de la síntesis de aminoácidos aromáticos fue la observación de que algunas bacterias con mutaciones de un solo gen requieren hasta cinco compuestos para crecer: fenilalanina, tirosina, triptófano, *p*-hidroxibenzoato y *p*-aminobenzoato. Todos estos compuestos contienen un anillo aromático. La incapacidad de los mutantes para crecer sin esos compuestos se invierte cuando se administra shikimato, lo que indica que este metabolito es un compuesto intermedio en la biosíntesis de todos estos

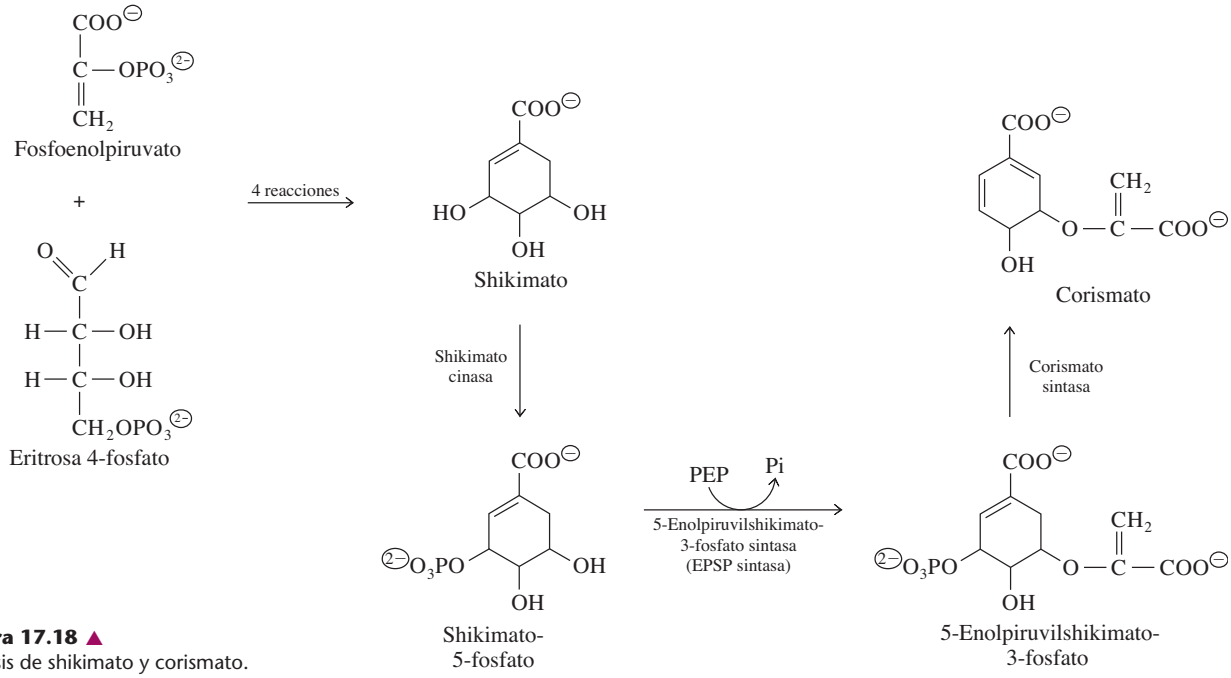
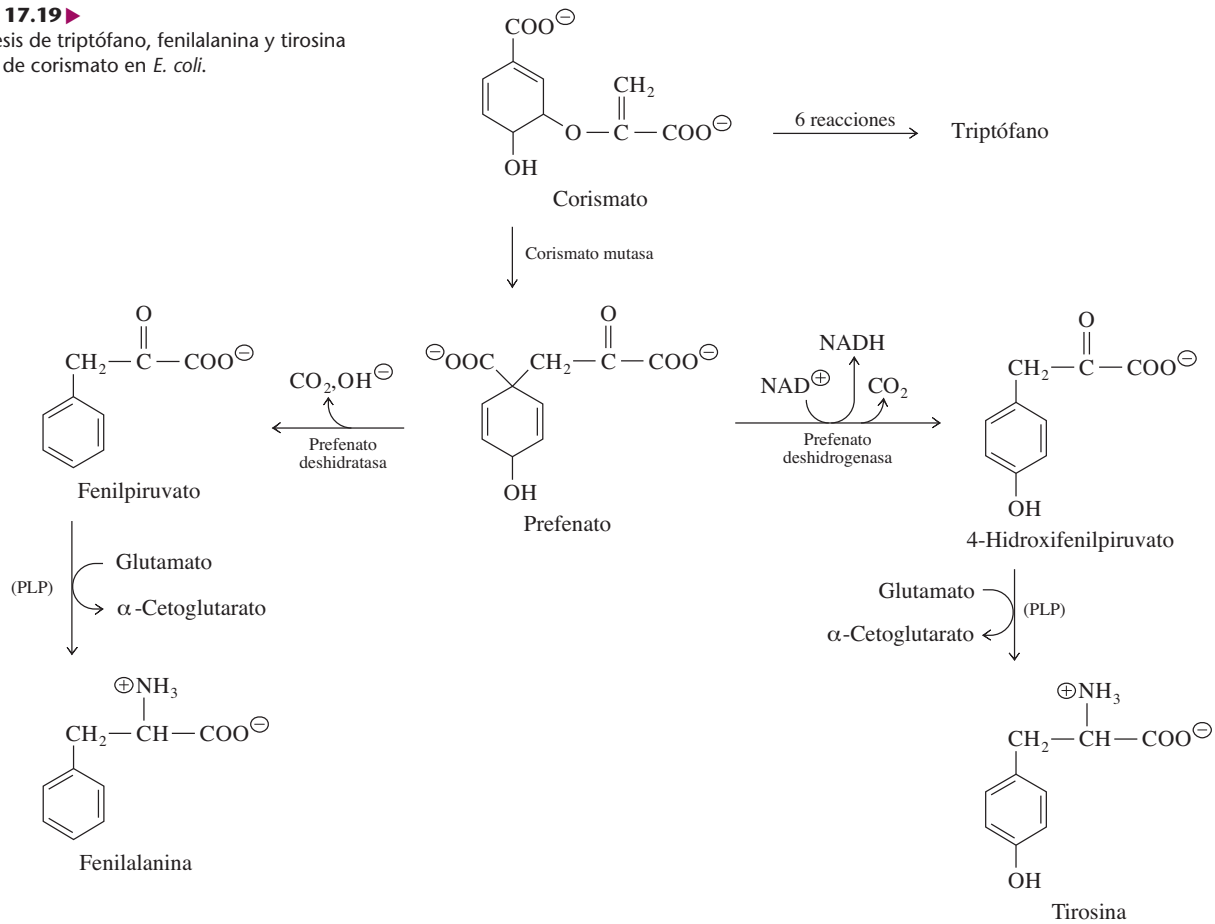


Figura 17.18 ▲
Síntesis de shikimato y corismato.

Figura 17.19 ▶
Biosíntesis de triptófano, fenilalanina y tirosina a partir de corismato en *E. coli*.



RECUADRO 17.2 Alimentos modificados genéticamente

La ruta de corismato es un objetivo eficaz de herbicidas, porque los compuestos que bloquean esta ruta en forma específica, en las plantas, no tienen efectos sobre los animales. Uno de los herbicidas generales más efectivos es glifosato. El glifosato inhibe la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSP sintasa) activando un inhibidor competitivo de enlazamiento con PEP.

$$^{2-}O_3P-CH_2-NH-CH_2-COO^{\ominus}$$

Glifosato
(*N*-(Fosfonometil)glicina)

El glifosato es el ingrediente activo del Roundup®, herbidida que mata todas las plantas. Se usa para eliminar mala hierba de carreteras y caminos. Aunque es poco costoso y eficaz como herbicida, no puede usarse para rociar cosechas en crecimiento activo, porque mata todas las plantas en forma indiscriminada ¡incluyendo la cosecha!

Se han identificado versiones resistentes de EPSP sintasa en muchas especies de bacterias. La enzima de la cepa CP4 de *Agrobacterium sp* se ha modificado genéticamente para permanecer totalmente activa en presencia de altas concentraciones de glifosato. El gen de esta CP4-EPSP sintasa bacteriana fue patentado y después introducido en soya, creando una planta genéticamente modificada resistente a glifosato. Monsanto vende esta nueva cepa de soya con el nombre de Roundup Ready®. Los campesinos que cultivan sembrados de Roungup Ready® pueden rociarlos con Roundup® (que también vende Monsanto) para matar las malas hierbas. Las ventajas económicas son importantes para los agricultores.

▲ 5-Enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa de *E. coli,* con una molécula de glifosato unida al sitio activo.

La mayor parte de la soya que se cultiva en la actualidad en Norteamérica está genéticamente modificada.

Ahora hay otras plantas Roundup Ready®. Se usan mucho versiones de maíz, almidón y canola, pero hay resistencia a usar trigo Roundup Ready®.

No todos los cultivos alimenticios genéticamente modificados contienen alteraciones a las enzimas de biosíntesis de aminoácidos. En la sección 23.9A se describen otros ejemplos.

compuestos aromáticos. El corismato es un derivado del shikimato, y es un compuesto intermedio clave en el punto de ramificación de la síntesis de aminoácidos aromáticos. La ruta al shikimato y al corismato (figura 17.18) comienza con la condensación de fosfoenolpiruvato y eritrosa 4-fosfato para formar un azúcar derivado con siete carbonos y P_i. Se requieren tres pasos adicionales, incluyendo la ciclación, para producir shikimato. La ruta de shikimato a corismato consiste en fosforilación de shikimato, adición de un grupo acetilo del fosfoenolpiruvato, y desfosforilación. Las rutas a partir de corismato llevan a fenilalanina, tirosina y triptófano. Los animales no tienen las enzimas de la ruta del corismato. No pueden sintetizar corismato y, en consecuencia, no pueden sintetizar cualquiera de los aminoácidos aromáticos.

Una ruta ramificada va del corismato a la fenilalanina o a la tirosina (figura 17.19). En la síntesis de fenilalanina en *E. coli*, una corismato mutasa-prefenato deshidratasa bifuncional cataliza el rearreglo de corismato para producir prefenato, compuesto altamente reactivo. A continuación, la enzima cataliza la eliminación de un ion hidróxido y CO_2 del prefenato, para formar el fenolpiruvato, compuesto totalmente aromático, que a continuación se transamina y forma fenilalanina.

Una corismato mutasa-prefenato deshidrogenasa bifuncional similar cataliza la formación de prefenato y después de 4-hidroxifenilpiruvato en el ramal de la tirosina. El compuesto intermedio sufre transaminación para formar tirosina. Varias bacterias y algunas plantas siguen las mismas rutas del corismato a la fenilalanina y tirosina que *E. coli*, aunque sus actividades de corismato mutasa y prefenato deshidratasa o prefenato deshidrogenasa están en cadenas separadas de polipéptidos. Algunas otras

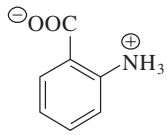


Figura 17.20 ▲
Antranilato.

bacterias usan rutas alternas, donde primero se transamina el prefenato y después se descarboxila.

La biosíntesis del triptófano a partir del corismato requiere cinco enzimas. En el primer paso, el nitrógeno de amida en la glutamina se transfiere al corismato; por eliminación del grupo hidroxilo y la mitad adyacente de piruvato en el corismato, se produce antranilato, compuesto aromático (figura 17.20). El antranilato acepta una mitad de fosforribosilo del PRPP. Por rearreglo de la ribosa, descarboxilación y cierre de anillo se genera el fosfato de indol y glicerol (indol glicerol fosfato).

Las dos reacciones finales de la biosíntesis del triptófano son catalizadas por triptófano sintasa (figura 17.21). En algunos organismos, los dos dominios catalíticos independientes de la triptófano sintasa están en una sola cadena de polipéptido. En otros organismos la enzima contiene dos tipos de subunidades en un tetrámero $\alpha_2\beta_2$. La subunidad o dominio α cataliza la escisión del indol glicerol fosfato a gliceraldehído 3-fosfato e indol. La subunidad o dominio β cataliza la condensación de indol y serina, en una reacción que requiere PLP como cofactor. El indol producido en la reacción catalizada por la subunidad α de los tetrámeros $\alpha_2\beta_2$ se canaliza (es decir, se transfiere directamente) al sitio activo de la subunidad β. Cuando se determinó por cristalografía de rayos X la estructura tridimensional de la triptófano sintasa de *Salmonella typhimurium* (microorganismo cuyo triptófano sintasa tiene la estructura oligomérica $\alpha_2\beta_2$), se descubrió un túnel que une los sitios activos α y β. El diámetro del túnel coincide con las dimensiones moleculares del indol, por lo que el paso del indol por el túnel explicaría por qué el indol se difunde y se aleja.

RECUADRO 17.3 Aminoácidos esenciales y no esenciales en los animales

Los humanos y otos animales no poseen las enzimas que se requieren en las síntesis de todos los aminoácidos. En consecuencia, los que no se pueden sintetizar son componentes esenciales de la dieta humana. Por regla general, las rutas que se han perdido son las que tienen más pasos. Una medida cruda de la complejidad de una ruta es la cantidad de moles de ATP (o su equivalente) en ella.

La tabla muestra la correlación entre el costo de determinada ruta, y el que un aminoácido sea esencial. Los aminoácidos se agrupan según sus precursores comunes, tal como se describió en las secciones anteriores. Nótese que lisina, metionina y treonina se derivan de un precursor común (sección 17.3B). Los tres aminoácidos son esenciales, porque los animales no pueden sintetizar al precursor. Valina, leucina e isoleucina son esenciales, porque los animales carecen de las enzimas clave que comparten las tres rutas de biosíntesis (sección 17.3C).

Energía necesaria en la biosíntesis de aminoácidos.

Aminoácido	**Moles de ATP requeridos por mol de aminoácido producido[a]**	
	No esencial	Esencial
Aspartato	21	
Asparagina	22–24	
Lisina		50 o 51
Metionina		44
Treonina		31
Alanina	20	
Valina		39
Leucina		47
Isoleucina		55
Glutamato	30	
Glutamina	31	
Arginina	44[b]	
Prolina	39	
Serina	18	
Glicina	12	
Cisteína	19[c]	
Fenilalanina		65
Tirosina	62[d]	
Triptófano		78
Histidina		42

[a]Los moles de ATP necesarios incluyen ATP usado para síntesis de precursores y conversión de precursores en productos.

[b]Esencial en algunos animales.

[c]La cisteína se puede sintetizar a partir de homocisteína, y la homocisteína es un producto de degradación de la metionina. La biosíntesis de la cisteína depende de que haya un suministro adecuado de metionina en la dieta.

[d]La tirosina puede sintetizarse a partir de la fenilalanina, aminoácido esencial.

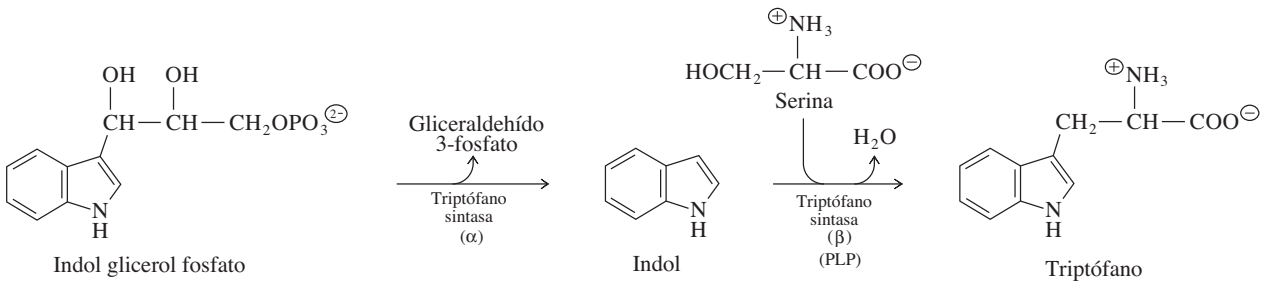


Figura 17.21 ▲
Reacciones catalizadas por la triptófano sintasa.

G. Histidina

La ruta para la biosíntesis de la histidina, de 10 pasos en las bacterias, comienza con una condensación entre el anillo de pirimidina en la porción de purina del ATP, y un derivado de la ribosa, fosforribosil pirofosfato (PRPP, *phosphoribosyl pyrophosphate*) (figura 17.22). En reacciones posteriores, se rompe el anillo de seis miembros en la mitad de la adenina y la glutamina dona un átomo de nitrógeno, que se incorpora por ciclación al anillo de imidazol del producto, que es imidazol glicerol fosfato. La mayor parte

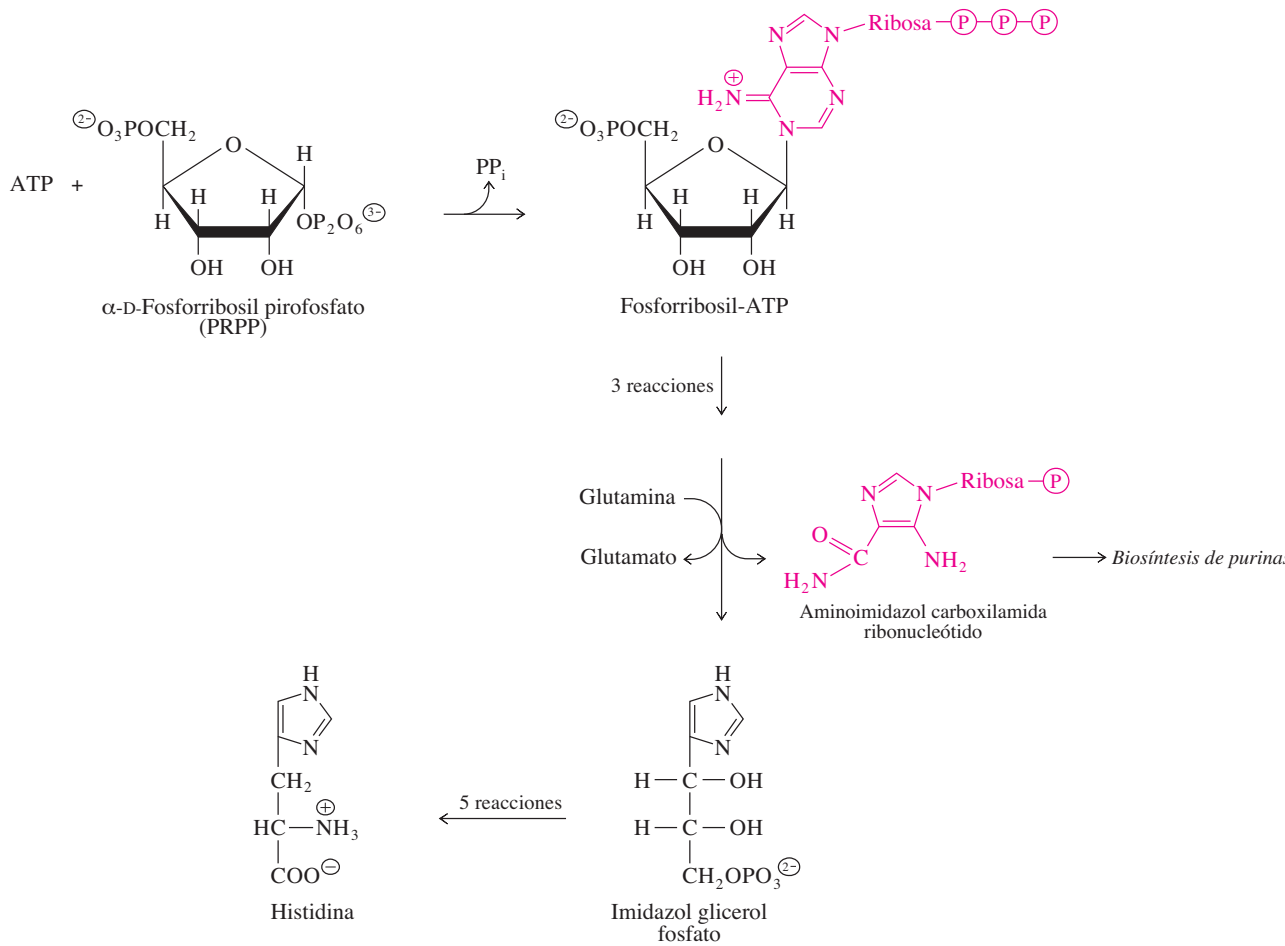


Figura 17.22 ▲
Síntesis de histidina a partir de fosforribosil pirofosfato (PRPP) y ATP. La histidina se deriva de PRPP (5 átomos de C), el anillo de purina de ATP (1 N y 1 C), glutamina (1 N) y glutamato (1 N).

de los átomos de carbono y nitrógeno del ATP se liberan como aminoimidazol carboxamida ribonucleótido, compuesto intermedio en la biosíntesis de la purina (sección 18.1). Este metabolito se puede reciclar posteriormente al ATP. El imidazol glicerol fosfato sufre deshidratación, transaminación por glutamato, eliminación hidrolítica de su fosfato, y oxidación desde un alcohol primario hasta un ácido carboxílico en dos pasos dependientes de $NAD^{\oplus}$, formándose la histidina.

17.4 Aminoácidos como precursores metabólicos

El papel principal de los aminoácidos es servir de sustratos en la síntesis de proteínas. En ese papel, los aminoácidos recién sintetizados se activan por unión covalente a ARNt. La reserva de aminoacilo-ARNt se usa como sustrato para síntesis de polipéptidos por la maquinaria de síntesis de proteínas. A esta ruta de biosíntesis de importancia fundamental se dedicará todo un capítulo (capítulo 22).

Algunos aminoácidos son precursores esenciales en otras rutas de biosíntesis. La lista es larga, y es imposible mencionar cada ruta. Algunas aminas reguladoras importantes se describieron en la sección 3.3 (histamina, GABA, epinefrina, tiroxina). En la sección 17.6F se describirá el importante papel de la metionina en la síntesis de la *S*-adenosilmetionina.

A. Productos derivados de glutamato, glutamina y aspartato

Ya se indicó que el glutamato y la glutamina son factores importantes en la asimilación del nitrógeno. Además, el glutamato y el aspartato son donadores de grupo amino en muchas reacciones de transaminación. Se verá que se requieren glutamato y aspartato en el ciclo de la urea. También se requieren como precursores tanto en la biosíntesis de la purina (sección 18.1) como en la de pirimidina (sección 18.3). Recuérdese que la síntesis del tetrahidrofolato con actividad biológica implica la adición de hasta seis residuos de glutamato a la mitad de tetrahidrofolato (sección 7.10).

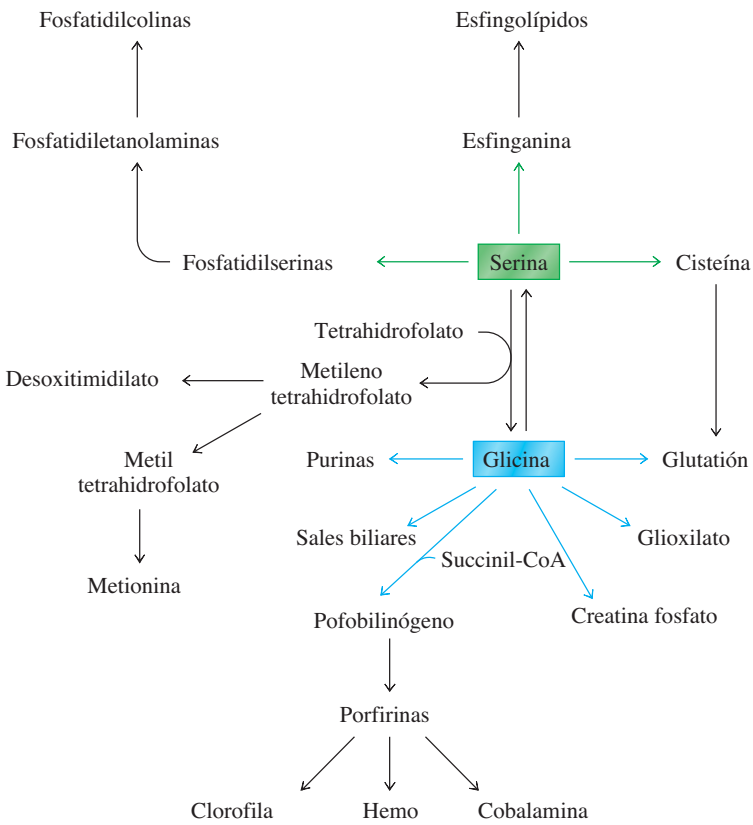
B. Productos derivados de serina y glicina

La serina y la glicina son precursores metabólicos de muchos otros compuestos (figura 17.23). Ya se describió el papel de la serina en la biosíntesis de los lípidos, en el capítulo anterior. La glicina y la succinil-CoA son los principales precursores en la ruta de la porfirina, que conduce al hemo y a la clorofila. También se requiere glicina en la biosíntesis de la purina (sección 18.1).

La conversión de serina en glicina se acopla a la síntesis de metileno tetrahidrofolato. Son importantes los derivados de tetrahidrofolato en muchas reacciones que catalizan la transferencia de unidades con un carbono (sección 17.10). La más importante de esas reacciones es la síntesis del desoxitimidilato (figura 18.15).

C. Síntesis de óxido nítrico a partir de arginina

Uno de los ejemplos más interesantes de aminoácidos como precursores metabólicos es el papel de la arginina como sustrato en la síntesis del óxido nítrico, derivado gaseoso inestable del nitrógeno, con una cantidad impar de electrones ($\cdot N{=}O$). Aunque es un radical libre reactivo y potencialmente tóxico, el óxido nítrico tiene importancia fisiológica; de hecho es tan importante que fue nombrado en 1992 la "molécula del año" por la revista *Sience*. Como gas, el NO se puede difundir rápidamente al interior de las células. Como el óxido nítrico en solución acuosa reacciona con rapidez con oxígeno y agua para formar nitratos y nitritos, existe *in vivo* sólo durante algunos segundos.

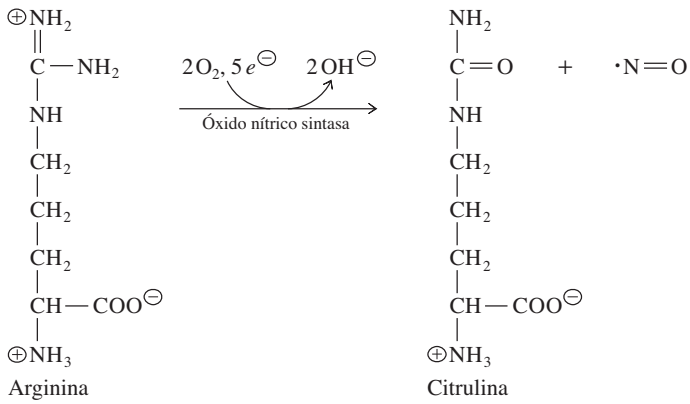


◀Figura 17.23
Compuestos que se forman a partir de serina y glicina.

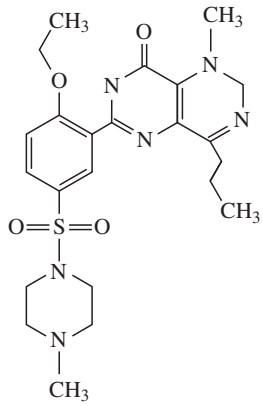
La óxido nítrico sintasa, enzima que se encuentra en los mamíferos, cataliza la formación de óxido nítrico y citrulina a partir de la arginina (figura 17.24). En la reacción se requieren los cofactores NADPH, FMN, FAD, un citocromo P450 y tetrahidrobiopterina (véase la sección 7.10). Todavía no se ha aclarado el mecanismo de acción de la tetrahidrobiopterina en esta reacción, pero parece ser un agente reductor necesario para la hidroxilación de la arginina. La óxido nítrico sintasa existe en dos formas, una constitutiva (es decir, que se sintetiza constantemente) dependiente de calcio, en las células cerebrales y endoteliales, y una forma inducible (es decir, sintetizada en forma variable) independiente de calcio, en los macrófagos (una clase de glóbulos blancos.

El óxido nítrico es una molécula mensajera que se une a una guanilil ciclasa soluble y estimula la formación de GMP cíclico (sección 9.12B). Tiene varias funciones. Por ejemplo, cuando se estimulan los macrófagos, sintetizan óxido nítrico. El radical óxido nítrico, de corta duración, es una de las armas que usan los macrófagos para matar a las bacterias y

En 1998, a Robert F. Furchgott, Luis J. Ignarro y Ferid Murad se les otorgó el Premio Nobel de Fisiología o Medicina "por sus descubrimientos acerca del óxido nítrico como molécula señalizadora en el sistema cardiovascular".



◀Figura 17.24
Conversión de arginina a óxido nítrico y citrulina. La fuente de los cinco electrones es NADPH.



▲Sildenafil. El citrato de sildenafil es el ingrediente activo de Viagra®.

células tumorales. Puede ser que el óxido nítrico interactúe con aniones superóxido ($\cdot O2^{\ominus}$) para formar reactivos más tóxicos, que expliquen su actividad de matar células.

También está presente óxido nítrico sintasa en las células que recubren los vasos sanguíneos. Bajo ciertas condiciones se produce óxido nítrico, y se difunde hacia las células musculares lisas de los vasos, haciendo que se relajen y bajen la presión sanguínea. La hipertensión y las fallas cardiacas consisten en la relajación defectuosa de los vasos sanguíneos. La nitroglicerina, que se usa para dilatar las arterias coronarias en el tratamiento de la angina de pecho, ejerce su efecto por virtud de su conversión metabólica en óxido nítrico.

El óxido nítrico también funciona como neurotransmisor en los tejidos cerebrales. Al parecer, las cantidades anormalmente altas de óxido nítrico que se forman durante un ataque matan algunas neuronas, del mismo modo que los macrófagos matan a las bacterias. Si se administra un inhibidor de óxido nítrico sintasa a un animal se obtiene cierta protección contra daños por ataques. Uno de los papeles del óxido nítrico como neurotransmisor es estimular la erección del pene. El sildenafil, ingrediente activo del Viagra®, es un medicamento para aliviar la disfunción eréctil. Es un inhibidor de fosfodiesterasa que bloquea la hidrólisis del GMP cíclico y con ello prolonga el efecto estimulante del óxido nítrico.

17.5 Recambio de proteínas

Se podría suponer que sólo las células en crecimiento, o en reproducción, necesitan nuevas proteínas (y por consiguiente un suministro de aminoácidos), pero no es el caso. Las proteínas se sintetizan y se degradan en forma continua en todas las células, proceso que se llama recambio (también renovación o rotación). Las proteínas individuales se renuevan con velocidades diferentes. Las vidas medias pueden variar desde unos pocos minutos hasta varias semanas, pero en general la vida media de determinada proteína en distintos órganos y especies es similar. Una renovación rápida de las proteínas asegura que algunas de ellas, las reguladoras, se degraden para que la célula pueda responder a las condiciones que cambian en forma constante. Esas proteínas han evolucionado hasta ser relativamente inestables. La velocidad de hidrólisis de una proteína se puede relacionar inversamente con la estabilidad de su estructura terciaria. El resultado es que las proteínas mal plegadas y las desdobladas se degradan con rapidez (sección 4.10).

En las células eucarióticas se degradan algunas proteínas a aminoácidos por hidrólisis lisosómica. Las vesículas que contienen el material por ser destruido se funden con los lisosomas y varias proteasas lisosómicas hidrolizan a las proteínas incluidas. Las enzimas lisosómicas tienen amplias especificidades hacia sustratos, por lo que todas las proteínas atrapadas son degradadas en forma extensa.

Algunas proteínas tienen vida media muy corta, porque están destinadas para la degradación en forma específica. También las proteínas anormales (mutadas) se hidrolizan en forma selectiva. La ruta de hidrólisis selectivas para esas proteínas en las células eucarióticas requiere la proteína ubiquitina. Unos grupos amino en la cadena lateral de los

RECUADRO 17.4 Apoptosis: muerte celular programada

La apoptosis es una serie de cambios morfológicos en una célula que causan su muerte. Entre los cambios están disminución del volumen celular, daños a la membrana plasmática, hinchamiento de las mitocondrias y la fragmentación de la cromatina. Las células sobrantes y perjudiciales se eliminan principalmente por acción de proteasas. Algunas células mueren en forma normal durante el desarrollo, o en el control de la producción de anticuerpos; otras mueren como resultado de enfermedades o por mala apoptosis (como en algunas enfermedades neurodegenerativas). El resultado de la apoptosis es que se forman vesículas de contenido celular, y quedan rodeadas por células vecinas. Algo del contenido proteínico de las vesículas puede ahorrarse y volverse a usar en las demás células.

Todos los eucariotas tienen un conjunto similar de enzimas endógenas responsables de la muerte celular. Esas enzimas (descritas por primera vez como parte de la apoptosis en 1993) comprenden más o menos una docena de proteasas llamadas caspasas, que quiere decir hidrolasas con contenido de cisteína que actúan sobre el lado de carboxilo en los residuos de aspartato.

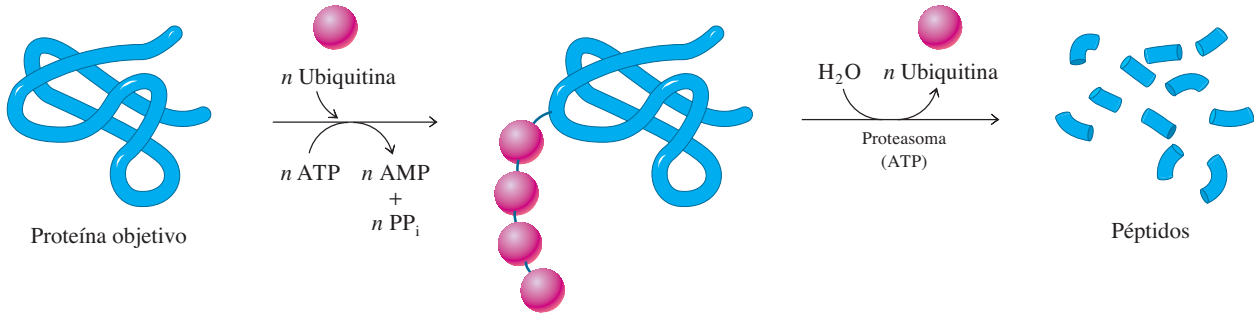


Figura 17.25 ▲
Ubiquitinación e hidrólisis de una proteína. Las enzimas de ubiquitinación catalizan la fijación de numerosas moléculas de ubiquitina a la proteína objetivo de la degradación. La proteasoma cataliza la hidrólisis dependiente de ATP de la proteína sustituida, y libera polipéptidos y ubiquitina.

residuos de lisina, en la proteína objetivo, se enlazan en forma covalente al término C de la ubiquitina en una ruta compleja, donde interviene la enzima activadora de ubiquitina (E1), enzima conjugante de ubiquitina (E2) y ubiquitina-proteína ligasa (E3). Esta ruta se acopla a la hidrólisis de ATP: una molécula de ATP se hidroliza por cada molécula de ubiquitina unida a la proteína objetivo. La proteína ubiquitinada se hidroliza y forma péptidos por acción de un complejo multiproteínico grande llamado proteasoma (o proteosoma) (figura 17.25). Este proceso sucede tanto en el citosol como en el núcleo. Otras proteasas catalizan la hidrólisis de los péptidos que resultan. Se requiere ATP para armar el proteasoma y para hidrolizar a la proteína ubiquitinada. Antes de haber descubierto esta ruta no había explicación para la sorprendente observación de que en la degradación de muchas proteínas se requiere ATP. (Recuérdese, de la sección 2.6, que la hidrólisis de un enlace peptídico es una reacción termodinámicamente favorable).

17.6 Catabolismo de aminoácidos

Los aminoácidos obtenidos en la degradación de las proteínas endógenas o en la dieta se pueden usar en la biosíntesis de proteínas nuevas. Los aminoácidos que no se necesitan en la síntesis de las proteínas se catabolizan para usar su nitrógeno y sus esqueletos de carbono. El primer paso en la degradación de aminoácidos es, con frecuencia, la eliminación del grupo α-amino. A continuación se alteran las cadenas de carbono en formas específicas, para que entren en las rutas centrales del metabolismo del carbono. Primero se describirán los destinos metabólicos de los diversos esqueletos de carbono. En la sección que sigue se examinará el metabolismo del amoniaco que se produce en la degradación de aminoácidos. Esas rutas catabólicas existen en todas las especies, pero tienen especial importancia en los animales, ya que los aminoácidos son una parte importante del metabolismo de los combustibles.

La eliminación del grupo α-amino de un aminoácido se efectúa de varias maneras. En general, el aminoácido sufre transaminación con α-cetoglutarato para formar un α-cetoácido y glutamato. El glutamato se oxida a α-cetoglutarato y amoniaco, por acción de la glutamato deshidrogenasa mitocondrial. El efecto neto de estas dos reacciones es el desprendimiento de grupos α-amino en forma de amoniaco, y la formación de NADH y α-cetoácidos. Es la inversa de la ruta que se ve en la figura 17.8A.

$$\text{Aminoácido} + \alpha\text{-Cetoglutarato} \rightleftharpoons \alpha\text{-Cetoácido} + \text{Glutamato}$$

$$\text{Glutamato} + NAD^{\oplus} + H_2O \rightleftharpoons \alpha\text{-Cetoglutarato} + NADH + H^{\oplus} + NH_4^{\oplus}$$

$$\text{Suma: Aminoácido} + NAD^{\oplus} + H_2O \rightleftharpoons \alpha\text{-Cetoácido} + NADH + H^{\oplus} + NH_4^{\oplus} \quad \textbf{(17.4)}$$

Los grupos amida de la glutamina y asparagina son hidrolizados por enzimas específicas: glutaminasa y asparaginasa, respectivamente, para producir amoniaco y los aminoácidos dicarboxílicos correspondientes: glutamato y aspartato. Se excreta el amoniaco de los grupos amida y amino que no se usan en las reacciones de síntesis.

Una vez eliminados los grupos amida, se pueden degradar las cadenas de carbono de los 20 aminoácidos, algunas hasta uno de los cuatro compuestos intermedios en el ciclo del ácido cítrico, otros a piruvato y otros más a acetil-CoA o acetoacetato, o bien a otros productos (figura 17.26). Cada aminoácido sigue su propia ruta hacia uno o más de esos siete compuestos. Si bien todos esos productos se pueden oxidar hasta CO_2 y H_2O, también pueden tener otros destinos metabólicos. Los aminoácidos que se degradan a piruvato o a compuestos intermedios en el ciclo del ácido cítrico se llaman glicogénicos, porque en forma directa pueden abastecer a la ruta de gluconeogénesis. Los que forman acetil-CoA o acetoacetato pueden contribuir a la formación de ácidos grasos o de cuerpos cetónicos, y se llaman cetogénicos. Algunos aminoácidos son glicogénicos y cetogénicos a la vez, porque distintas partes de sus cadenas de carbono forman productos diferentes. Es importante la distinción entre productos glicogénicos y cetogénicos en los animales, ya que los aminoácidos son metabolitos de combustible importantes en la dieta. Los animales no poseen una ruta eficiente que vaya de acetil-CoA a glucosa, y la producción de un exceso de acetil-CoA estimula la formación de cuerpos cetónicos (sección 16.11). Es menos importante la distinción entre productos glicogénicos y cetogénicos en las bacterias, protistas, hongos y plantas, ya que pueden convertir acetil-CoA en oxalacetato por la ruta de glioxilato (sección 13.7). En esos organismos, el acetil-CoA es glicogénico.

En esta sección se examinarán las rutas de degradación de aminoácidos, comenzando por las más simples. Se trata de indicar la forma en que los átomos de carbono de cada aminoácido llegan a los metabolitos "glicogénicos" (piruvato e intermedios en el ciclo del ácido cítrico) o metabolitos "cetogénicos" (acetil-CoA y acetoacetato). El destino final de esos metabolitos depende de la especie, y se describió en los capítulos anteriores.

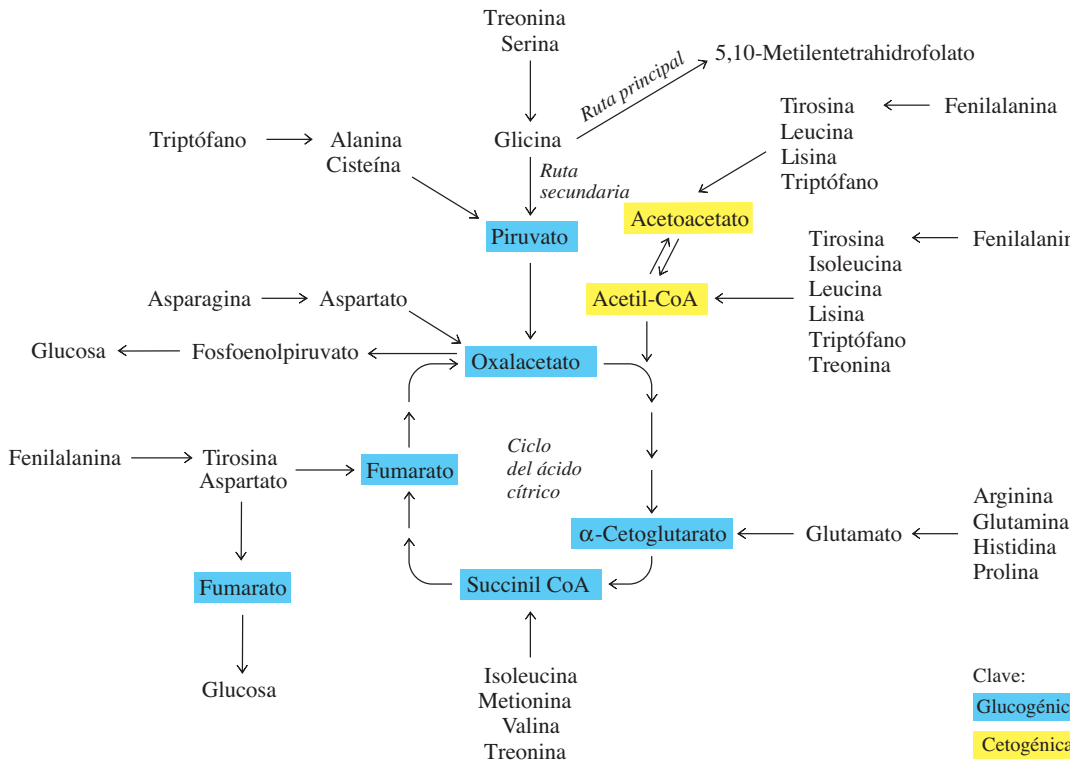


Figura 17.26 ▲
Conversión de los esqueletos de carbono de aminoácidos en piruvato, acetoacetato, acetil-CoA o intermedios en el ciclo del ácido cítrico, para el catabolismo siguiente. Este diagrama muestra cuáles aminoácidos son glicogénicos y cuáles son cetogénicos.

A. Alanina, asparagina, aspartato, glutamato y glutamina

La alanina, el aspartato y el glutamato se sintetizan mediante reacciones reversibles de transaminación (secciones 17.3A, C y D). La degradación de esos tres aminoácidos consiste en su regreso a las rutas de donde surgieron sus esqueletos de carbono. La alanina origina piruvato, el aspartato oxalacetato, y la glutamina α-cetoglutrato, por inversión de las reacciones originales de transaminación. Los tres aminoácidos son glicogénicos, porque el aspartato y el glutamato se convierten en compuestos intermedios en el ciclo del ácido cítrico, y la alanina se convierte en piruvato.

La degradación de la glutamina y la asparagina comienza con su hidrólisis a glutamato y aspartato, respectivamente. Así, la glutamina y la asparagina son glicogénicas. Las reacciones de hidrólisis son catalizadas por enzimas catabólicas específicas: glutaminasa y asparaginasa.

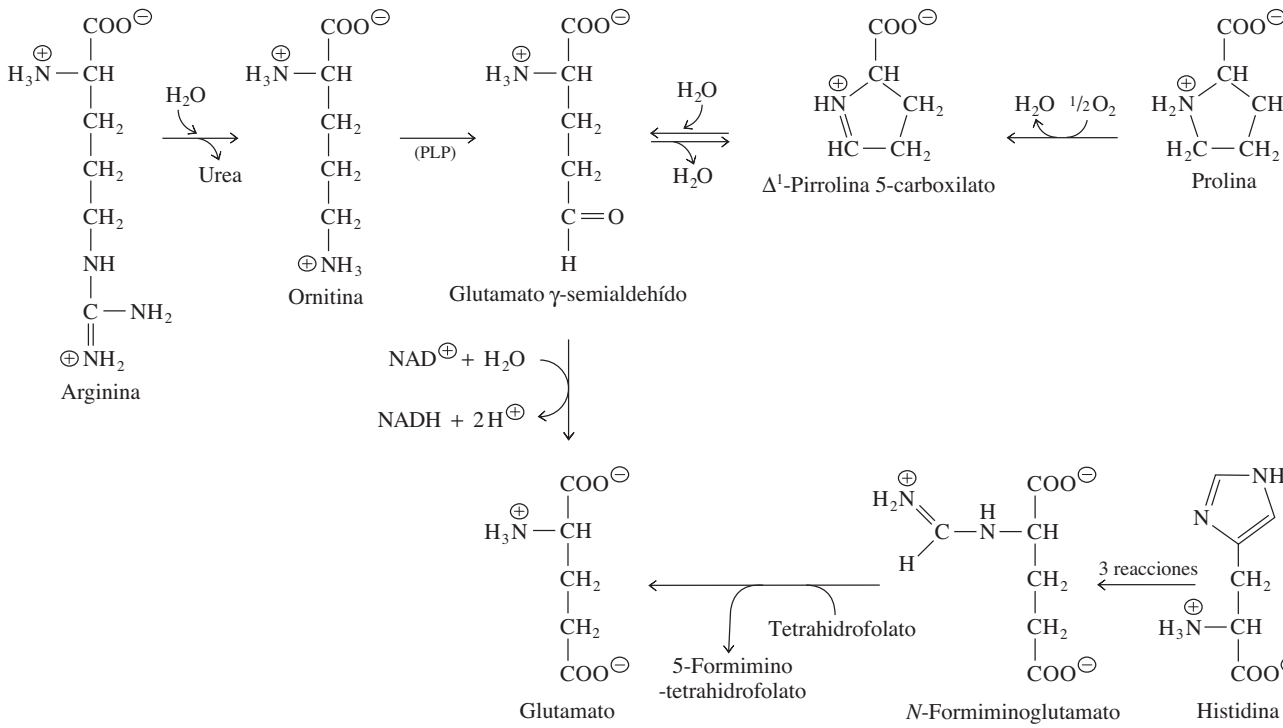
B. Arginina, histidina y prolina

Las rutas de degradación de arginina, histidina y prolina convergen en el glutamato (figura 17.27). En el caso de la arginina y la prolina, las rutas de degradación se parecen a las de biosíntesis. La degradación de la arginina comienza con la reacción catalizada por arginasa. La ornitina producida se transamina en glutamato γ-semialdehído, que se oxida y forma glutamato.

La prolina se convierte en glutamato en tres pasos. Primero se oxida por oxígeno molecular en una reacción catalizada por una enzima diferente a la que requiere piridina nucleótido, de la ruta de biosíntesis de prolina (compárense las figuras 17.27 y 17.13). A continuación el anillo de la base de Schiff (el 5-carboxilato) se abre por hidrólisis no enzimática. El producto es glutamato γ-semialdehído, y se oxida para formar glutamato.

La ruta principal de degradación de histidina produce también glutamato. La histidina sufre desaminación no oxidante, hidratación y apertura del anillo, para formar *N*-formiminoglutamato. La mitad formimino ($-NH-CH=NH_2^{\oplus}$) se transfiere a

Figura 17.27 ▼
Rutas catabólicas principales para arginina, prolina e histidina.



continuación a tetrahidrofolato, formando 5-formiminotetrahidrofolato y glutamato. Entonces, el 5-formiminotetrahidrofolato se desamina enzimáticamente para formar 5,10-meteniltetrahidrofolato. El grupo de un carbono (metenilo) en este derivado de tetrahidrofolato se puede usar en rutas como la síntesis de purina.

C. Glicina y serina

Hay dos rutas para la degradación de la serina (figura 17.28). En algunos organismos o tejidos, una pequeña cantidad de serina se convierte en forma directa a piruvato por acción de serina deshidratada, enzima dependiente de PLP. Sin embargo, la mayor parte de la serina se convierte en glicina por acción de la serina hidroximetiltransferasa. Es la misma reacción que da como resultado la síntesis de glicina en la ruta de biosíntesis, como se ve en la figura 17.15, y es una reacción que produce 5,10-metileno tetrahidrofolato (5,10-metileno THF).

Se puede convertir una pequeña cantidad de glicina en serina, por la reacción inversa de la serina hidroximetiltransferasa, y los átomos de carbono en la glicina pueden terminar en piruvato cuando se desaminan las moléculas de serina. Sin embargo, la principal ruta de degradación de la glicina en todas las especies es la conversión a $NH_4^{\oplus}$ y $HCO_3^{\ominus}$ por el sistema de escisión de glicina.

En la catálisis por el sistema de escisión de glicina se requiere un complejo enzimático que contiene cuatro subunidades idénticas. PLP, lipoamida y FAD son grupos prostéticos y $NAD^{\oplus}$ y tetrahidrofolato (THF) son cosustratos. Al principio se descarboxila la glicina, y el grupo $—CH_2—NH_3^{\oplus}$ se transfiere a lipoamida. A continuación se libera $NH_4^{\oplus}$ y el grupo restante, de un carbono, se transfiere al tetrahidrofolato para formar 5,10-metilentetrahidrofolato (5,10 metileno THF). La lipoamida reducida se oxida por el FAD y el $FADH_2$ reduce al portador móvil $NAD^{\oplus}$.

El sistema de escisión de glicina es otro ejemplo de un mecanismo de brazo oscilante de lipoamida, parecido en principio al de la piruvato deshidrogenasa (sección 13.1). Aunque la descomposición de la glicina es reversible *in vitro*, el sistema de escisión de glicina cataliza una reacción irreversible en las células. La irreversibilidad de la secuencia de reacciones se debe en parte a los valores de K_m para los productos amoniaco y metilentetrahidrofolato, que son mucho mayores que las concentraciones de esos compuestos *in vivo*.

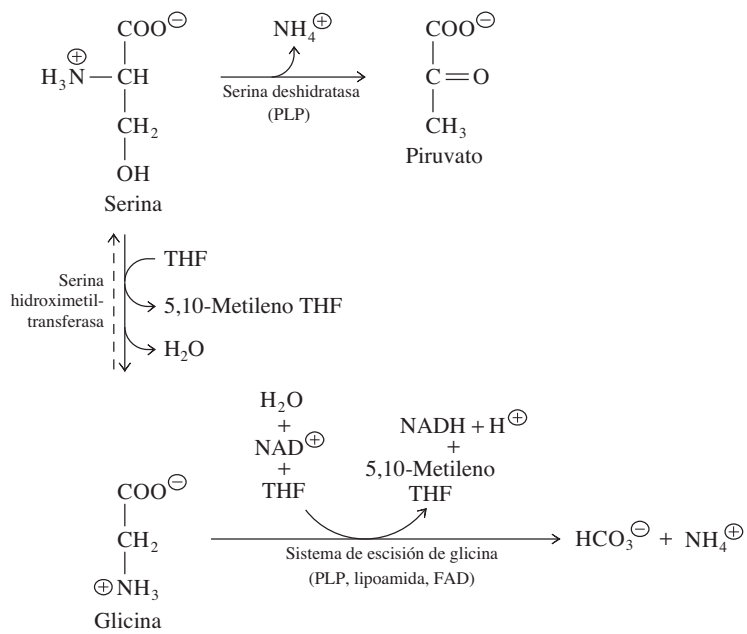


Figura 17.28 ▶
Catabolismo de serina y glicina.

D. Treonina

Hay varias rutas para la degradación de la treonina. En la ruta principal, la treonina se oxida a 2-amino-3-cetobutirato, en una reacción catalizada por treonina deshidrogenasa (figura 17.29). El 2-amino-3-cetobutirato puede sufrir tiólisis para formar acetil-CoA y glicina. Otra ruta de catabolismo de la treonina es la ruptura para formar acetaldehído y glicina, por acción de la treonina aldolasa. En muchos tejidos y organismos, en realidad la treonina aldolasa es una actividad secundaria de la serina hidroximetiltransferasa. El acetaldehído se puede oxidar a acetato por acción de la acetaldehído deshidrogenasa, y el acetato se puede convertir en acetil-CoA por la acetil-CoA sintetasa.

Una tercera ruta de catabolismo de la treonina en los mamíferos es la desaminación a α-cetobutirato. Esta reacción es catalizada por serina deshidratasa, la misma enzima que cataliza la conversión de serina en piruvato. Esta reacción produce α-cetobutirato para la síntesis de isoleucina en la mayoría de las especies (sección 17.3C). En la ruta de degradación, el α-cetobutirato de puede convertir en propionil-CoA, precursor del compuesto intermedio succinil-CoA en el ciclo del ácido cítrico. Así, la treonina puede producir succinil-CoA, o bien glicina + acetil-CoA, dependiendo de la ruta por la que se catabolice.

La ruta de propionil-CoA a succinil-CoA se ve con detalle en la figura 16.22.

E. Aminoácidos de cadena ramificada

Leucina, valina e isoleucina se degradan por rutas afines (figura 17.30, página siguiente). Las mismas tres enzimas catalizan los tres primeros pasos de todas las rutas. El primer paso, transaminación, es catalizado por el aminoácido de cadena ramificada transaminasa.

El segundo paso en el catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada es catalizado por el α-cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa. En esta reacción, los α-cetoácidos de cadena ramificada tienen descarboxilación oxidante para formar moléculas de acil-CoA de cadena ramificada, un átomo de carbono más corto que los α-cetoácidos precursores. La α-cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa es un complejo multienzimático que contiene lipoamida y pirofosfato de tiamina (TPP) y

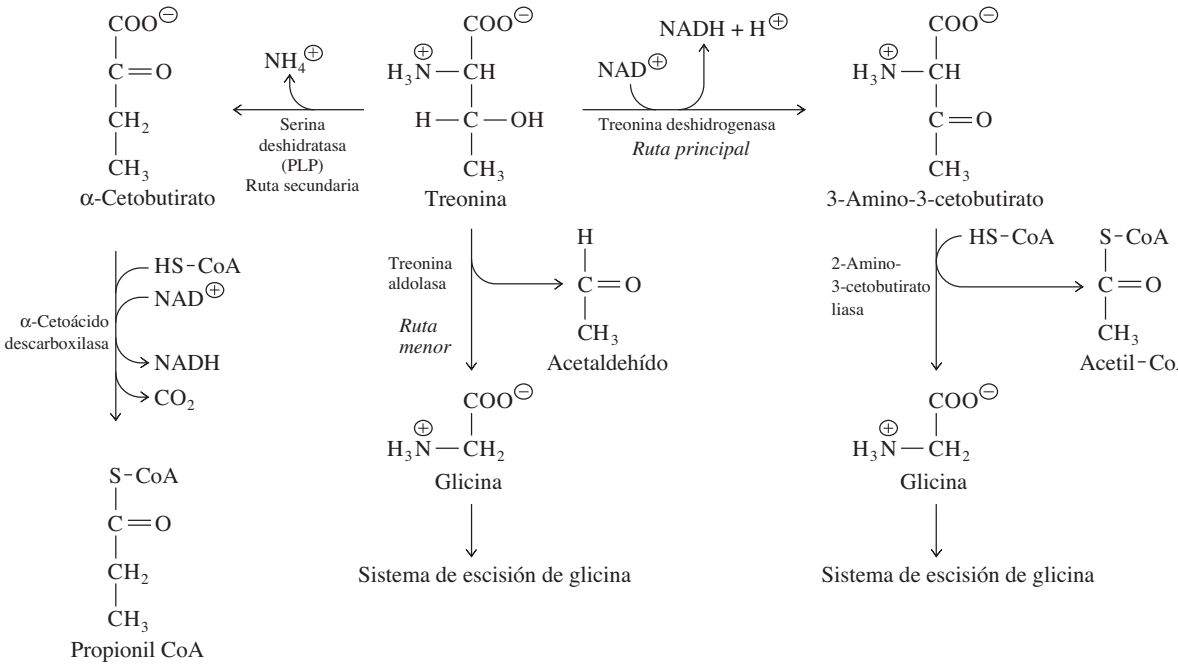


Figura 17.29 ▲
Rutas alternas de degradación de treonina.

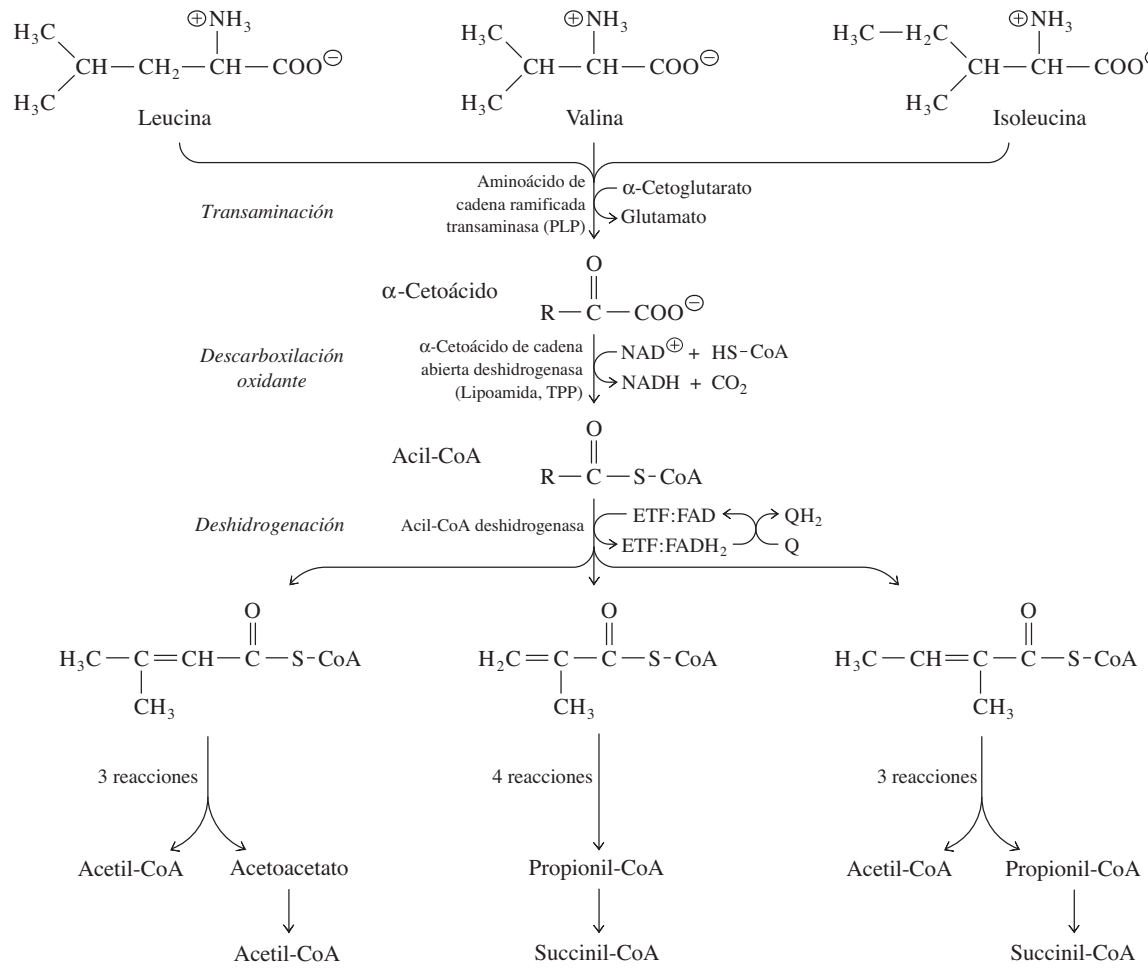


Figura 17.30 ▲
Catabolismo de aminoácidos ramificados. R representa la cadena lateral de leucina, valina o isoleucina.

requiere $NAD^{\oplus}$ y coenzima A. Su mecanismo catalítico es parecido al del complejo de piruvato deshidrogenasa (sección 13.1) y del complejo α-cetoglutarato deshidrogenasa (sección 13.3, parte 4). La α-cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa contiene las mismas subunidades de dihidrolipoamida deshidrogenasa (E_3) que las que se encuentran en otros complejos de deshidrogenasas.

Las moléculas de acil-CoA de cadena ramificada se oxidan por una acil-CoA deshidrogenasa que contiene FAD, en una reacción análoga al primer paso de la oxidación de los acilos grasos-CoA (figura 16.19). Los electrones eliminados en este paso de oxidación se transfieren a través de la flavoproteína de transferencia de electrones (ETF, *electron transferring flavoprotein*) y se forma ubiquinona (Q).

En este punto divergen los pasos en el catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada. Todos los carbonos de la leucina terminan por convertirse en acetil-CoA, por lo que la leucina es enteramente cetogénica. La valina se convierte, en último término, en propionil-CoA. Como en la degradación de la treonina, la propionil-CoA se convierte en succinil-CoA, que entra al ciclo del ácido cítrico. En consecuencia, la valina es glicogénica. La ruta de degradación de la isoleucina lleva a propionil-CoA y también a acetil-CoA. Entonces, la isoleucina es glicogénica (por la vía de la succinil-CoA formada a partir de propionil-CoA) y cetogénica (a través de la acetil-CoA). Así, aunque

los pasos iniciales en la degradación de los tres aminoácidos de cadena ramificada son similares, sus esqueletos de carbono tienen destinos diferentes.

F. Metionina

Uno de los papeles principales de la metionina es su conversión a *S*-adenosilmetionina, donador activado de metilo (sección 7.3). La transferencia del grupo metilo de la *S*-adenosilmetionina a un aceptor de metilo deja sola a la *S*-adenosilhomocisteína, que se degrada por hidrólisis a homocisteína y adenosina (figura 17.31). La homocisteína puede metilarse por el 5-metiltetrahidrofolato y formar metionina, o bien puede reaccionar con serina y formar cistationina, que se puede romper a cisteína y α-cetobutirato. Ya se encontró esta serie de reacciones antes, como parte de una ruta de formación de cisteína (figura 17.17). Por esta ruta los mamíferos pueden formar cisteína usando un átomo de azufre del aminoácido esencial metionina. El α-cetobutirato se convierte en propionil-CoA por acción de una α-cetoácido deshidrogenasa. La propionil-CoA se puede seguir metabolizando a succinil-CoA, por lo que la metionina es glicogénica.

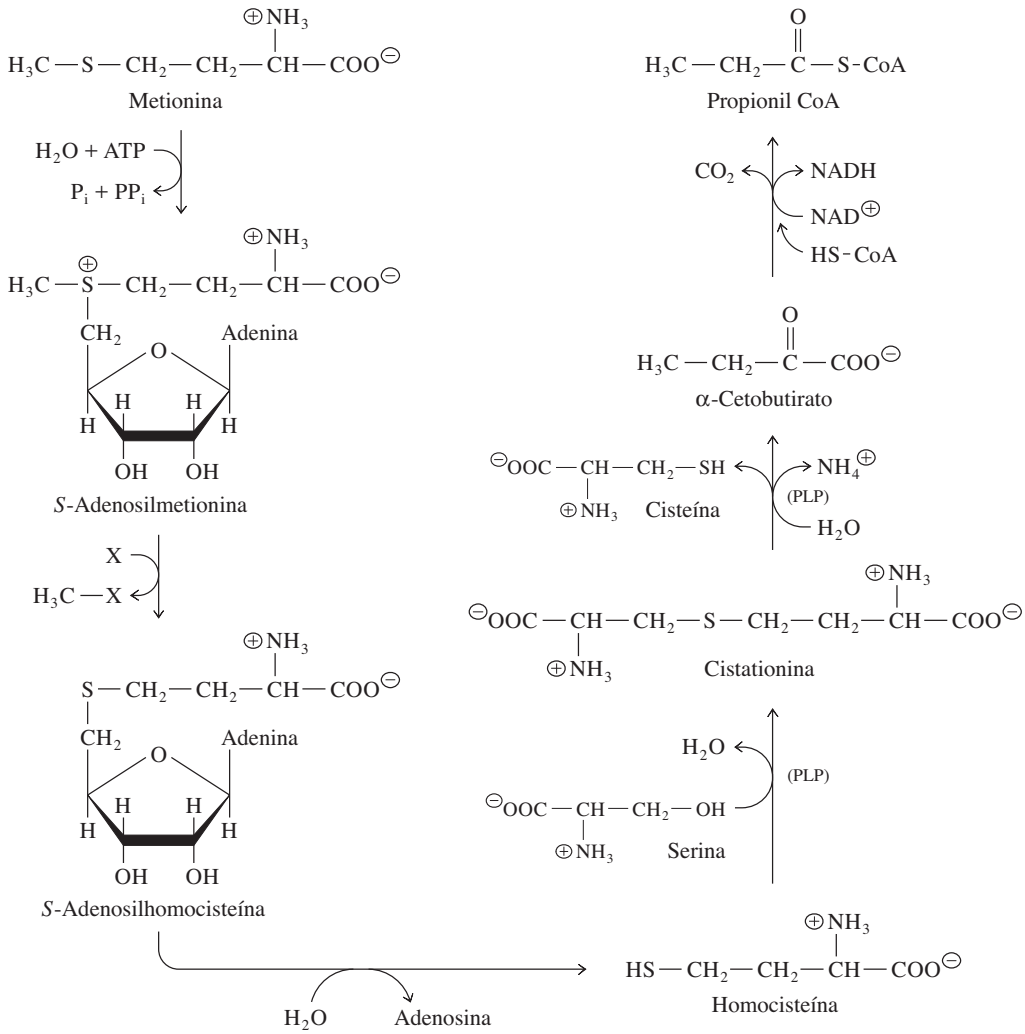


Figura 17.31 ▲
Conversión de metionina en cisteína y propionil-CoA. En el segundo paso, X representa a cualquiera de varios aceptores de grupo metilo.

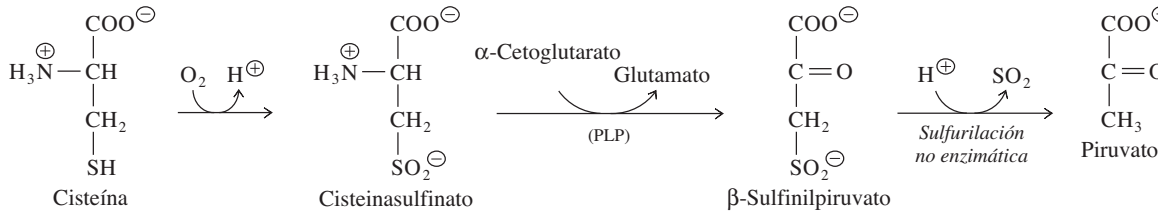


Figura 17.32▲
Conversión de cisteína en piruvato.

G. Cisteína

La ruta principal del catabolismo de cisteína es de tres pasos, que termina en piruvato (figura 17.32). Por consiguiente, la cisteína es glicogénica. Primero se oxida la cisteína a cisteinasulfinato, que pierde su grupo aminoácido por transaminación, y forma *β*-sulfinilpiruvato. Por desulfurilación no enzimática se produce piruvato.

H. Fenilalanina, triptófano y tirosina

Los aminoácidos aromáticos comparten una pauta común de catabolismo. En general, las rutas comienzan con oxidación seguida por eliminación de nitrógeno por transaminación o hidrólisis, y después abertura de anillo acoplada con oxidación.

La conversión de fenilalanina en tirosina, catalizada por fenilalanina hidroxilasa, es un paso importante en el catabolismo de la fenilalanina (figura 17.33). También sirve como fuente principal de tirosina en los animales, ya que carecen de la ruta normal de corismato para la síntesis de tirosina. La reacción de fenilalanina hidroxilasa requiere oxígeno molecular y tetrahidrobiopterina, agente reductor. Un átomo de oxígeno del O_2 se incorpora a la tirosina, y el otro se convierte en agua.

La tetrahidrobiopterina se regenera en dos pasos. La 4a-carbinolamina deshidratasa cataliza la deshidratación del primer producto oxidado y evita su isomerización

RECUADRO 17.5 Fenilcetonuria, defecto en la formación de tirosina

Una de las afecciones más comunes en el metabolismo de aminoácidos es la fenilcetonuria. Esta enfermedad se debe a una mutación en el gen que codifica a la fenilalanina hidroxilasa. Las personas afectadas no pueden convertir la fenilalanina de su dieta en tirosina, y la sangre de niños con esta enfermedad contiene concentraciones muy altas de fenilalanina, y concentradiones bajas de tirosina. En lugar de convertirse en tirosina, la fenilalanina se metaboliza en fenolpiruvato, con la inversa de la reacción de transaminación de la figura 17.19. (La transaminación de la fenilalanina no sucede en las personas no afectadas, porque la K_m de la transaminasa para fenilalanina es mucho mayor que la concentracion normal de fenilalanina). Las grandes concentraciones de fenilpiruvato y sus derivados causan retardo mental irreversible.

A los recién nacidos se les examina rutinariamente con la finalidad de detectar fenilcetonuria, analizando si hay altas concentraciones de fenilpiruvato en la orina, o de fenilalanina en la sangre, durante los primeros días después del nacimiento. Si se limita en forma estricta la toma dietética de fenilalanina durante la primera década de vida, con frecuencia se desarrollan normalmente las personas con deficiencia de hidroxilasa. Algunas mujeres con fenilcetonuria deben restringir su ingestión dietética de fenilalanina durante el embarazo, para asegurar el correcto desarrollo fetal. Las concentraciones elevadas de fenilalanina también se observan en personas con deficiencias de dihidropteridina reductasa, o 4a-carbinolamina deshidratasa, o con defectos en la biosíntesis de tetrahidrobiopterina, porque cada una de esas afecciones causa mala hidroxilación de la fenilalanina.

Aunque con el control de la dieta se puede tratar bien la fenilcetonuria, entre las restricciones hay muchos alimentos ricos en proteína, como carne, pescado, leche, pan y pasteles. El alimento para esta dieta tan estricta no es apetitoso. Se han hecho pruebas alimentando pacientes con fenilcetonuria con una enzima que cataliza la degradación de la fenilalanina para formar amoniaco y un producto carbonado no tóxico. Esta enzima no sustituye totalmente a la restricción dietética de fenilalanina, pero puede aumentar la tolerancia de un paciente hacia alimentos proteinados.

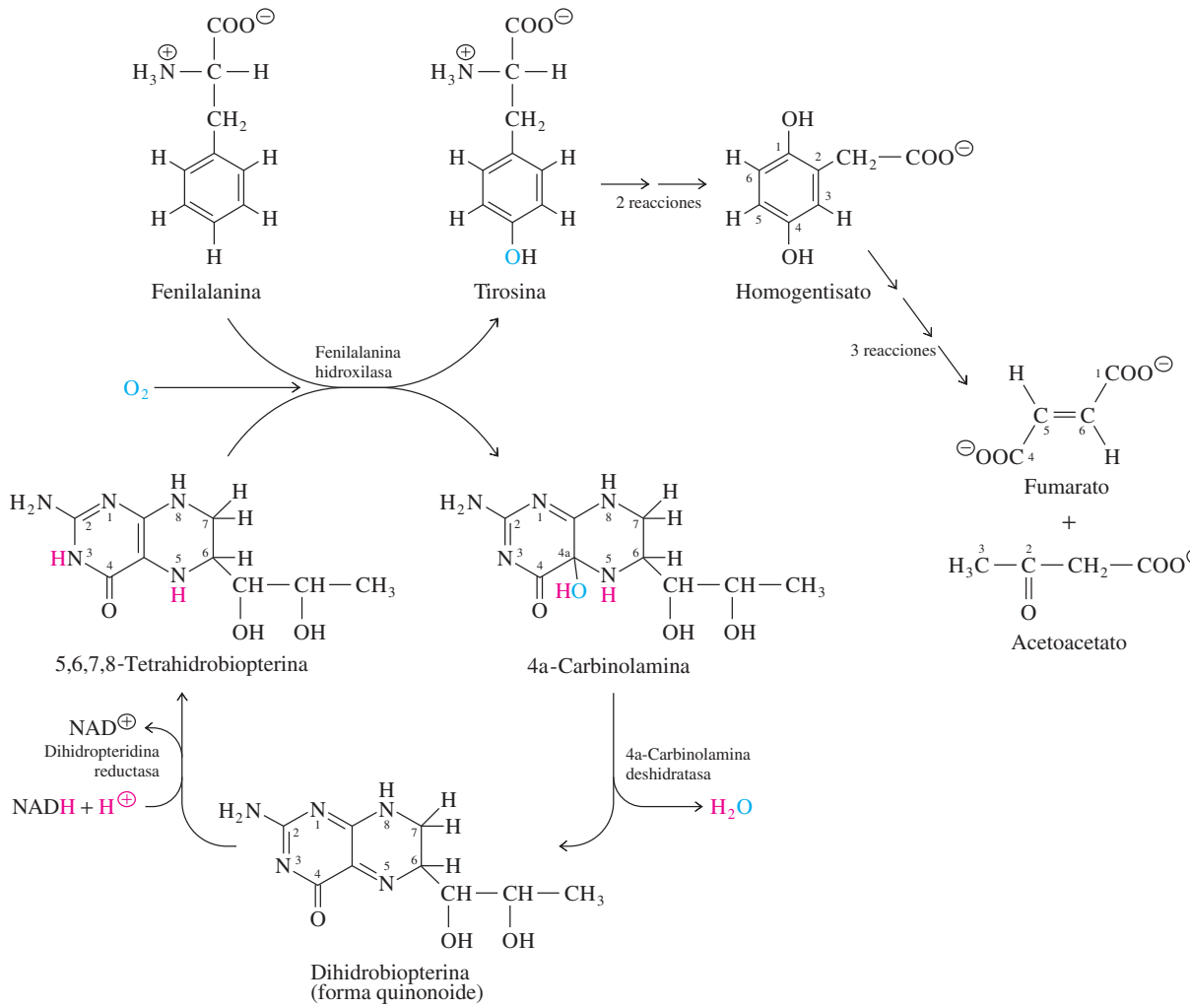


Figura 17.33 ▲
Conversión de fenilalanina y tirosina en fumarato y acetoacetato. El cofactor tetrahidrobiopterina se regenera por deshidratación y reducción dependiente de NADPH.

a una forma inactiva (donde la cadena lateral está en el C-7 y no en el C-6). La dihidropteridina reductasa cataliza la reducción de la dihidrobiopterina quinonoide a 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina, en una reacción que requiere NADH. La tetrahidrobiopterina también es un agente reductor en la síntesis del óxido nítrico a partir de la arginina (sección 17.4C).

El catabolismo de la tirosina comienza con la eliminación de su grupo α-amino en una reacción de transaminación con α-cetoglutarato. Los pasos de oxidación que siguen llevan a la abertura del anillo, y por último a los productos finales, fumarato y acetoacetato. Este fumarato es citosólico, y se convierte en glucosa. El acetoacetato es un cuerpo cetónico. Por lo anterior, la tirosina es glicogénica y cetogénica al mismo tiempo.

El sistema de anillos del indol en el triptófano tiene una ruta más compleja de degradación, donde hay dos reacciones de abertura de anillo. La ruta principal de catabolismo de triptófano en el hígado y en muchos microorganismos lleva al α-cetoadipato, y por último a la acetil-CoA (figura 17.34). La alanina, producida en las primeras fases del catabolismo del triptófano, se transamina a piruvato. Entonces, el catabolismo del triptófano es cetogénico y glicogénico a la vez.

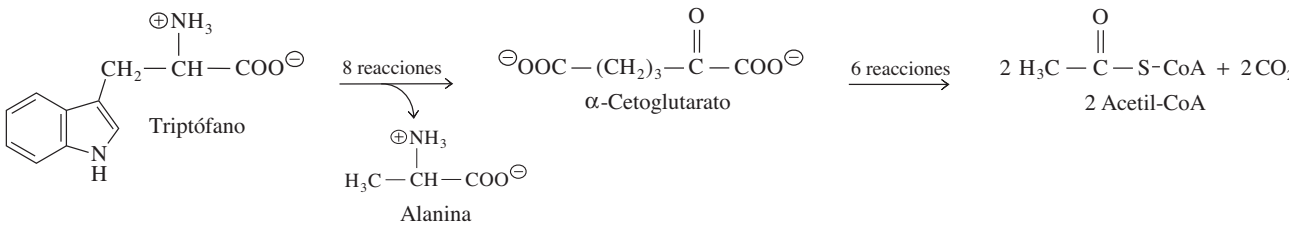


Figura 17.34 ▲
Conversión de triptófano en alanina y acetil-CoA.

I. Lisina

La ruta principal de degradación de la lisina genera el producto intermedio sacaropina, por la condensación de α-cetoglutarato con lisina (figura 17.35). Unas reacciones sucesivas de oxidación producen α-aminoadipato, que pierde su grupo amino por transaminación con α-cetoglutarato, para transformarse en α-cetoadipato; éste se convierte después en acetil-CoA por los mismos pasos que tiene la degradación del triptófano. Como la leucina, la lisina es cetogénica (estas dos son los dos únicos aminoácidos comunes totalmente cetogénicos).

RECUADRO 17.6 Enfermedades del metabolismo de ácidos grasos

Se han descubierto cientos de enfermedades metabólicas humanas causadas por a defectos de un gen (que con frecuencia se llaman errores innatos de metabolismo). Muchas se deben a defectos en la descomposición de aminoácidos. Ya se ha descrito la fenilcetonuria, el defecto de formación de tirosina a partir de fenilalanina (recuadro 17.5). A continuación se mencionarán unos cuantos ejemplos más. Los defectos en algunas rutas son graves, e incluso ponen en riesgo la vida, en tanto que los defectos en otras rutas pueden causar síntomas menos graves. Los resultados indican que algunas rutas de degradación son casi indispensables, en tanto que otras son esenciales para la supervivencia después del nacimiento.

Alcaptonuria

La primera enfermedad metabólica caracterizada como defecto genético fue la alcaptonuria, enfermedad rara donde se acumula uno de los compuestos intermedios en el catabolismo de la fenilalanina y la tirosina-homogentisato (figura 17.33). Una deficiencia de homogentisato dioxigenasa, la enzima que cataliza la ruptura oxidante de este compuesto intermedio, evita más metabolismo de este catabolito. Las soluciones de homogentisato se ennegrecen en el reposo, porque ese compuesto se convierte en un pigmento. La alcaptonuria fue reconocida al observar el oscurecimiento de la orina. Las personas con alcaptonuria son propensas a desarrollar artritis, pero no se sabe cómo produce el defecto metabólico esta complicación; es posible que se deba al depósito de pigmentos en huesos y tejidos conectivos.

Cistinuria

Si hay un defecto en el transporte renal de cisteína y los aminoácidos básicos, la cisteína se acumula en la sangre, y se oxida a cistina, que produce un estado llamado cistinuria. La cistina tiene poca solubilidad y forma cálculos. Los pacientes de cistinuria toman grandes cantidades de agua para disolver esos cálculos, o se les administran compuestos que reaccionan con cistina para formar derivados solubles.

Atrofia girada

Un defecto en la actividad de la ornitina transaminasa causa la atrofia girada, enfermedad metabólica de la coroides y la retina, en los ojos. La atrofia girada causa visión en túnel y después la ceguera. El avance de esta afección puede desacelerarse restringiendo la ingestión de arginina, o la administración de piridoxina.

Enfermedad de jarabe de maple de la orina

Los pacientes que padecen esta enfermedad orinan con olor a jarabe de maple. Esta enfermedad se debe a un defecto genético en el segundo paso del catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada, el paso catalizado por el complejo de cadena ramificada α-cetoácido deshidrogenasa. Quienes padecen esta enfermedad tienen vida corta, a menos que tengan una dieta con muy bajo contenido de aminoácidos de cadena ramificada.

Hiperglicinemia no cetótica

Los defectos en el complejo enzimático que cataliza la escisión de glicina causan la acumulación de grandes cantidades de glicina en los líquidos corporales. Es el principal síntoma bioquímico de una enfermedad llamada hiperglicinemia no cetótica. La mayoría de quienes padecen esta enfermedad son muy retardados y mueren en la infancia. La gravedad de esta enfermedad indica la importancia tan grande que tiene el sistema de escisión de glicina.

17.7 Ciclo de la urea: conversión de amoniaco en urea

Las altas concentraciones de amoniaco son tóxicas para las células. Distintos organismos han evolucionado estrategias diferentes para eliminar el amoniaco de desecho. La naturaleza del producto de excreción depende de la disponibilidad de agua. En muchos organismos acuáticos el amoniaco se difunde directamente a través de las membranas celulares, y se diluye en el agua circundante. Esta ruta es ineficiente en los organismos multicelulares terrestres grandes, y deben evitar la acumulación de amoniaco dentro de las células internas.

La mayoría de los vertebrados terrestres convierten el amoniaco de desecho en urea, producto menos tóxico (figura 17.36), compuesto sin carga y muy soluble en agua, producido en el hígado y arrastrado por la sangre hasta los riñones donde es excretado como principal soluto en la orina. (La urea fue descrita por primera vez alrededor de 1720, como la sal esencial de la orina. El nombre "urea" se deriva de "orina"). Las aves y muchos reptiles terrestres convierten el amoniaco sobrante en ácido úrico, compuesto relativamente insoluble que precipita de la solución acuosa y forma un lodo semisólido. El ácido úrico también es un producto de la degradación de nucleótidos de purina en las aves, algunos reptiles y los primates.

La síntesis de la urea se efectúa casi exclusivamente en el hígado. La urea es el producto de una serie de reacciones llamada ciclo de la urea. Esta ruta fue descubierta por Hans Krebs y Kurt Henseleit en 1932, algunos años antes de que Krebs descubriera el ciclo del ácido cítrico. Varias observaciones llevaron a identificar el ciclo de la urea. Por ejemplo, las secciones de hígado de ratas pueden efectuar la conversión neta de amoniaco en urea. La síntesis de la urea por esas preparaciones se estimula en forma marcada cuando se agrega el aminoácido ornitina, y la cantidad de urea sintetizada supera mucho la cantidad de ornitina que se agrega, lo que parece indicar que la ornitina actúa en forma catalítica. Por último, se sabía que hay altas concentraciones de la enzima arginasa en el hígado de todos los organismos que sintetizan urea.

A. Síntesis de carbamoíl fosfato

El amoniaco producido por desaminación oxidante de glutamato reacciona con bicarbonato para formar carbamoíl fosfato. Esta reacción requiere dos moléculas de ATP, y es catalizada por carbamoíl fosfato sintetasa (figura 17.37, página siguiente). Esta enzima existe en todas las especies, ya que el carbamoíl fosfato es un precursor esencial en la biosíntesis de la pirimidina, y también se requiere en la síntesis de arginina en especies que no tienen ciclo de la urea. Los mamíferos tienen dos versiones de esta enzima. La versión citosólica se llama carbamoíl fosfato sintetasa II. Usa glutamina y no amoniaco como donador de nitrógeno, y es la enzima que se usa en la síntesis de la pirimidina (sección 18.3). Las enzimas bacterianas también usan glutamina. La segunda versión, carbamoíl fosfato I, es la que participa en el ciclo de la urea. Es una de las enzimas más abundantes en las mitocondrias hepáticas, formando hasta 20% de las proteínas en la matriz mitocondrial. El átomo de nitrógeno en el carbamoíl fosfato se incorpora en la urea por el ciclo de la urea.

B. Reacciones del ciclo de la urea

El primer átomo de nitrógeno de la urea es aportado por el carbamoíl fosfato, y el segundo se deriva de aspartato. La síntesis de la urea se efectúa mientras los compuestos intermedios están unidos en forma covalente a un esqueleto de ornitina. Así, la ornitina funciona catalíticamente en la síntesis de la urea (figura 17.38, página 551). Los átomos de carbono, nitrógeno y oxígeno de la ornitina no se intercambian en el ciclo de la urea. Su papel como catalizador es más obvio que el papel del oxalacetato en el ciclo del ácido cítrico (sección 13.3).

Las reacciones reales en el ciclo de la urea son más complejas que el esquema sencillo que muestra la figura 17.38. Esto se debe a que la primera reacción se efectúa en la

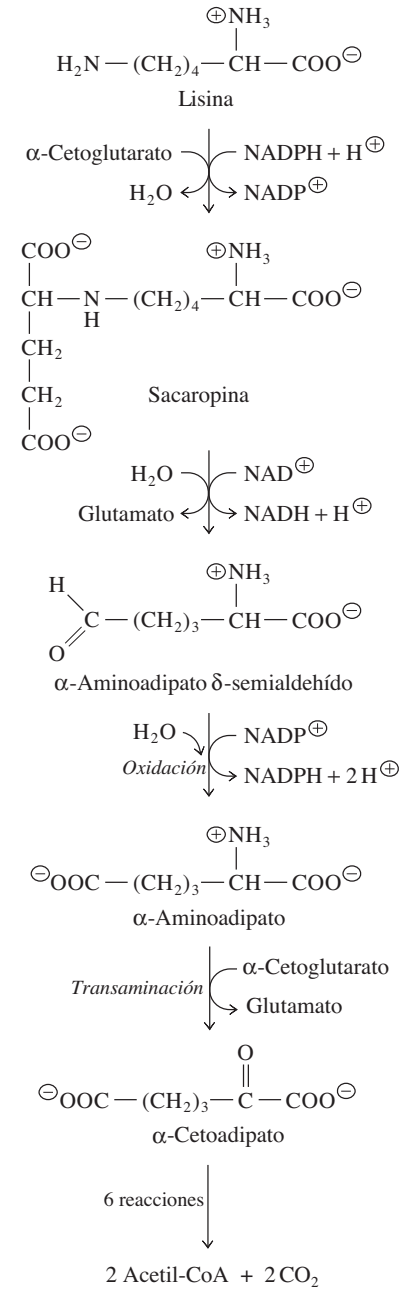


Figura 17.35 ▲
Conversión de lisina en acetil CoA.

La degradación posterior del ácido úrico se describe en la sección 18.8.

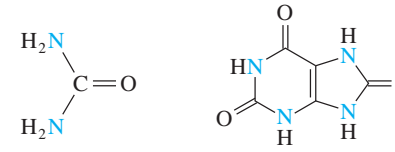


Figura 17.36 ▲
Urea y ácido úrico.

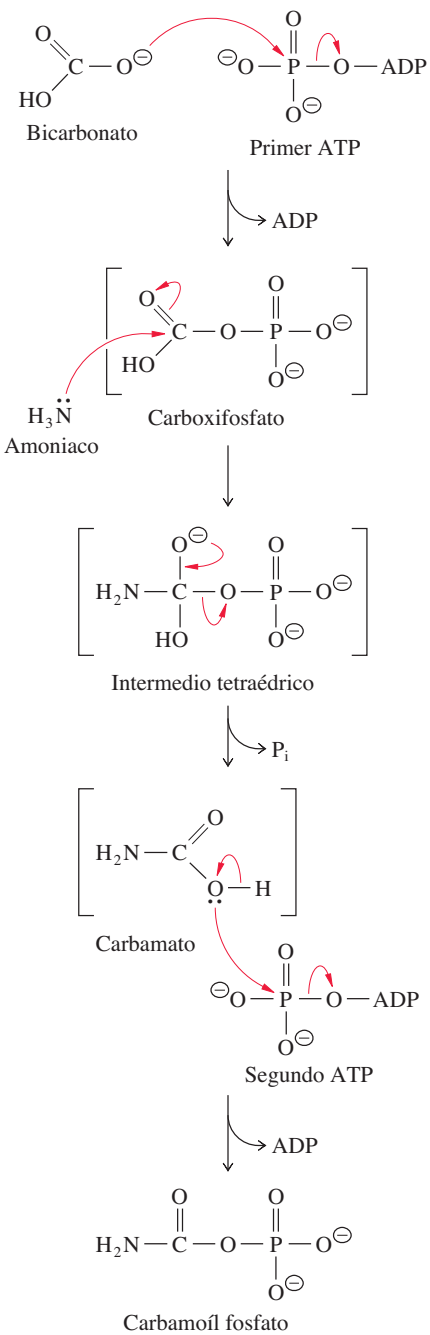


Figura 17.37 ▲
Síntesis de carbamoíl fosfato catalizada por carbamoíl fosfato sintetasa I. La reacción consiste en dos transferencias de grupo fosforilo. En la primera, un ataque nucleofílico por bicarbonato sobre ATP produce caboxifosfato y ADP. A continuación, el amoniaco reacciona con el carboxifosfato y forma un intermedio tetraédrico. La eliminación de un grupo de fosfato produce carbamato. Una segunda transferencia de grupo fosforilo, de otra ATP, forma carbamoíl fosfato y ADP. Las estructuras entre corchetes permanecen unidas a la enzima durante la reacción.

matriz mitocondrial y las otras tres suceden en el citosol (figura 17.39, página 552). Se requieren dos proteínas de transporte que conectan la matriz mitocondrial con el citosol: el intercambiador citrulina-ornitina y la glutamato-aspartato translocasa.

1. En la primera reacción, el carbamoíl fosfato reacciona en la mitocondria con ornitina, para formar citrulina en una reacción catalizada por ornitina transcarbamoilasa. Este paso incorpora al átomo de nitrógeno del amoniaco en la citrulina; así, la citrulina contiene la mitad del nitrógeno destinado a la urea. Después la citrulina es transportada fuera de la mitocondria, a cambio de ornitina citosólica.
2. El segundo átomo de nitrógeno destinado a la urea viene del aspartato, y se incorpora cuando la citrulina se condensa con aspartato para formar argininosuccinato en el citosol. Esta reacción dependiente de ATP es catalizada por argininosuccinato sintetasa. La mayor parte del aspartato en las células se origina en las mitocondrias, aunque a veces se genera en el citosol. El aspartato mitocondrial entra al citosol a cambio de glutamato citosólico.
3. El argininosuccinato se escinde en forma no hidrolítica, y se convierte en arginina más fumarato, en una reacción de eliminación catalizada por argininosuccinato liasa. La arginina es el precursor inmediato de la urea. (Juntos, el segundo y tercer paso del ciclo de la urea son ejemplos de una estrategia de donación del grupo amino en el aspartato, que se encontrará dos veces en el siguiente capítulo como parte de la biosíntesis de las purinas. Los procesos clave son una condensación dependiente de nucleósido trifosfato seguida por la eliminación de fumarato).
4. En la reacción final del ciclo de la urea, el grupo guanidinio de la arginina se rompe hidrolíticamente para formar ornitina y urea en una reacción catalizada por arginasa. La arginasa tiene un par de iones Mn^{2+} en su sitio activo. Este grupo binuclear de manganeso se enlaza a una molécula de agua, que forma un ion hidróxido nucleofílico que ataca al átomo de carbono del guanidinio en la arginina. La ornitina generada por acción de la arginasa es transportada al interior de la mitocondria, donde reacciona con carbamoíl fosfato para sostener el funcionamiento continuo del ciclo de la urea.

La reacción general de la síntesis de la urea es

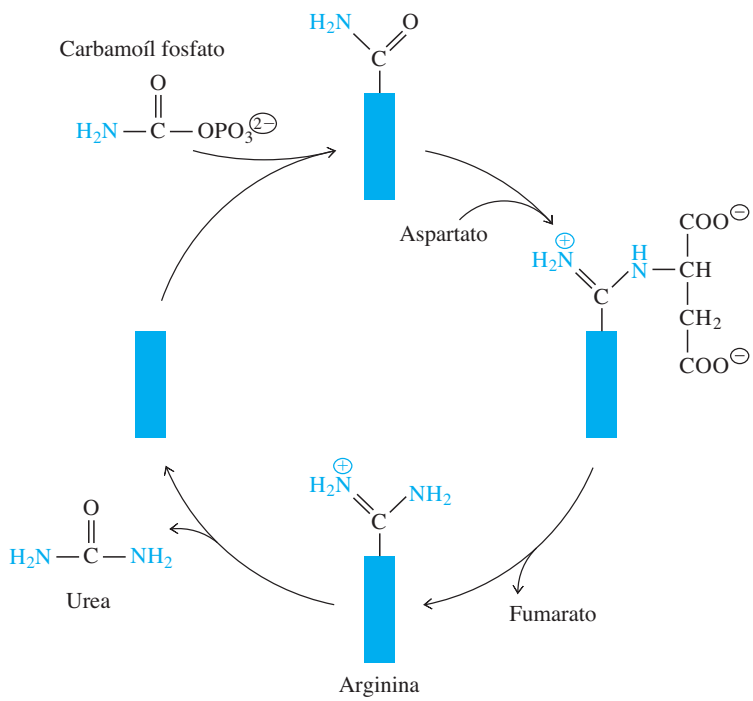
$$NH_3 + HCO_3^{\ominus} + \text{Aspartato} + 3\ \text{ATP} \longrightarrow \text{Urea} + \text{Fumarato} + 2\ \text{ADP} + 2\ P_i + \text{AMP} + PP_i \qquad \textbf{(17.5)}$$

Los dos átomos de nitrógeno de la urea se derivan del amoniaco y del aspartato. El átomo de carbono de la urea viene del bicarbonato. Se consumen cuatro equivalentes de ATP por molécula de urea sintetizada. Se convierten tres moléculas de ATP en dos de ADP y una de AMP durante la formación de una molécula de urea, y la hidrólisis de pirofosfato inorgánico causa la escisión del cuarto enlace de fosfoanhídrido.

El esqueleto de carbonos del fumarato se convierte en glucosa y CO_2. El fumarato no entra al ciclo del ácido cítrico (que se efectúa en las mitocondrias), sino que se hidrata a malato por acción de una fumarasa citosólica. El malato se oxida a oxalacetato por acción de la malato deshidrogenasa, y entonces entra el oxalacetato a la ruta de gluconeogénesis. Este destino lo comparte el fumarato producido durante la degradación de la tirosina (sección 17.6H).

C. Reacciones anexas al ciclo de la urea

Las reacciones del ciclo de la urea convierten en urea cantidades iguales de nitrógeno proveniente de amoniaco y de aspartato. Muchos aminoácidos pueden funcionar como donadores de grupo amino mediante reacciones de transaminación con α-cetoglutarato, formando glutamato. El glutamato puede sufrir transaminación con oxalacetato para



◀Figura 17.38
El ciclo de la urea. Los rectángulos grises representan ornitina.

formar aspartato, o bien desaminación para formar amoniaco. Tanto la glutamato deshidrogenasa como la aspartato transaminasa son abundantes en las mitocondrias hepáticas, y catalizan reacciones casi en equilibrio. Las concentraciones de amoniaco y aspartato deben ser aproximadamente iguales para que la síntesis de la urea y la eliminación del nitrógeno sean eficientes.

Imagine un caso teórico de un sobrante relativo de amoniaco (figura 17.40a, página 553). En esta situación, la reacción casi en equilibrio que cataliza la glutamato deshidrogenasa avanzaría en la dirección de formación de glutamato. Las concentraciones elevadas de glutamato causarían entonces un mayor flujo hacia el aspartato, a través de la aspartato transaminasa, que también es un paso cercano al equilibrio. En contraste, cuando hay exceso de aspartato, el flujo neto en las reacciones catalizadas por glutamato deshidrogenasa y aspartato transaminasa avanzarían en dirección contraria, formándose amoniaco para la creación de urea (figura 17.40b).

Aunque la mayor parte de los aminoácidos tienen desaminación en el hígado, algunos se desaminan en los músculos. La glicólisis, fuente principal de energía en los músculos, produce piruvato. La transferencia de grupos amino de α-aminoácidos a piruvato genera grandes cantidades de alanina. La alanina viaja por el torrente sanguíneo hasta el hígado, donde se desamina y regresa a piruvato. El grupo amino se usa para la síntesis de urea, y el piruvato se convierte en glucosa por gluconeogénesis. Recuérdese que ninguna de estas rutas opera en los músculos. La glucosa puede regresar al tejido muscular.

RECUADRO 17.7 El hígado está organizado para eliminar amoniaco tóxico

Con estudios en células hepáticas de mamíferos se ha demostrado que en ellas hay diferencias en actividad enzimática, que dependen de su ubicación. Las células más cercanas a la entrada de la sangre (células periportales) tienen la máxima capacidad para sintetizar urea, en tanto que la síntesis de la glutamina sólo se efectúa en las células más cercanas a la salida (células perivenosas). La sangre se encuentra sucesivamente con estos sistemas de eliminación de amoniaco, distribuidos en forma recíproca. Cuando la sangre llega a las células periportales, la mayor parte del amoniaco se elimina como urea. La actividad de glutamina sintetasa en las células perivenosas secuestra entonces al amoniaco que ha escapado a la formación de urea, y asegura que haya muy poco amoniaco que se salve de destoxificación en el hígado.

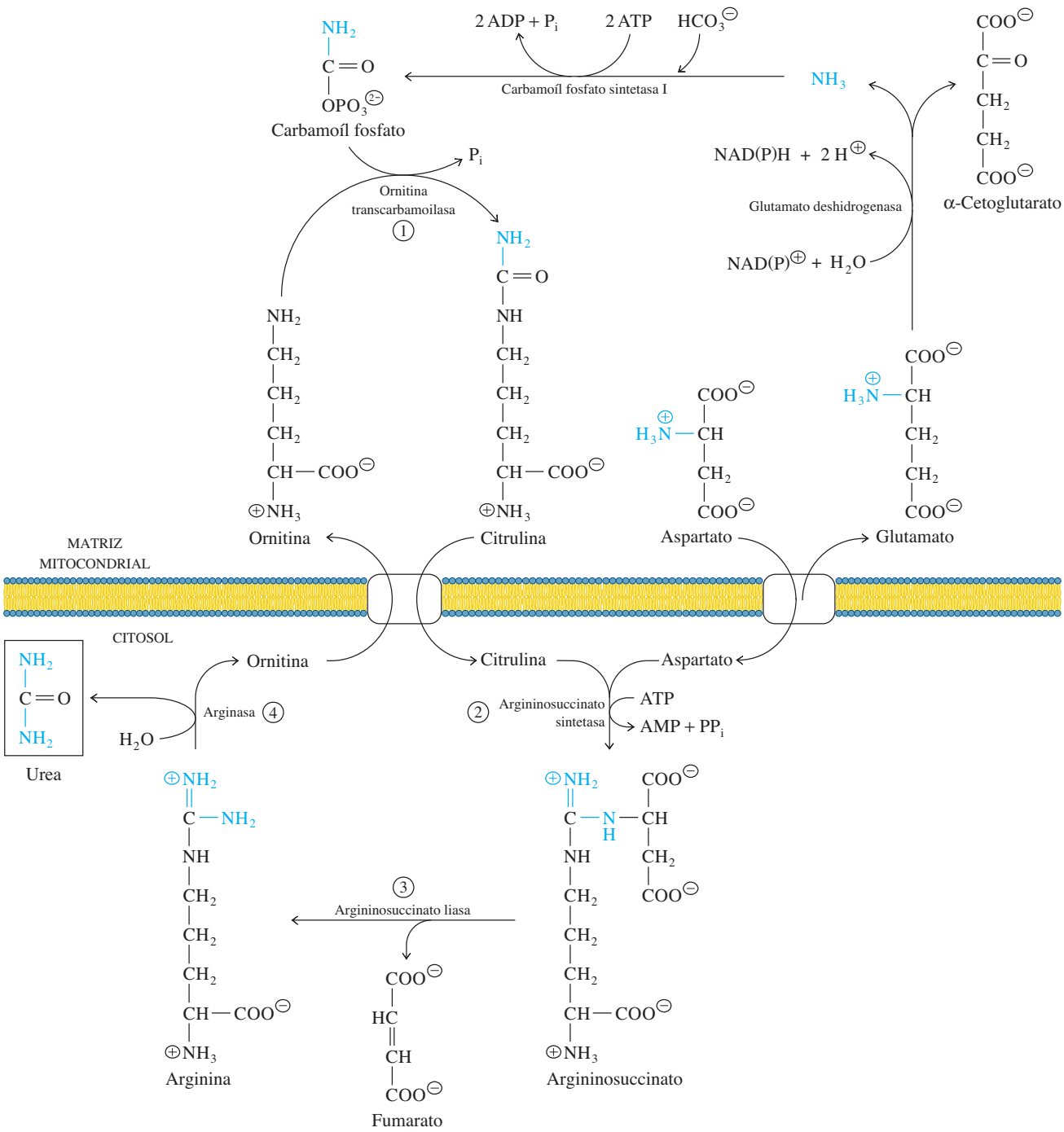


Figura 17.39 ▲
El ciclo de la urea.

También, el piruvato puede convertirse en oxalacetato, que se transforma en la cadena de carbonos del aspartato, metabolito que dona uno de los átomos de nitrógeno de la urea. El intercambio de glucosa y alanina entre músculos e hígado, llamado ciclo de glucosa-alanina (figura 17.41) proporciona un medio indirecto para que los músculos eliminen nitrógeno y reabastezcan su suministro energético.

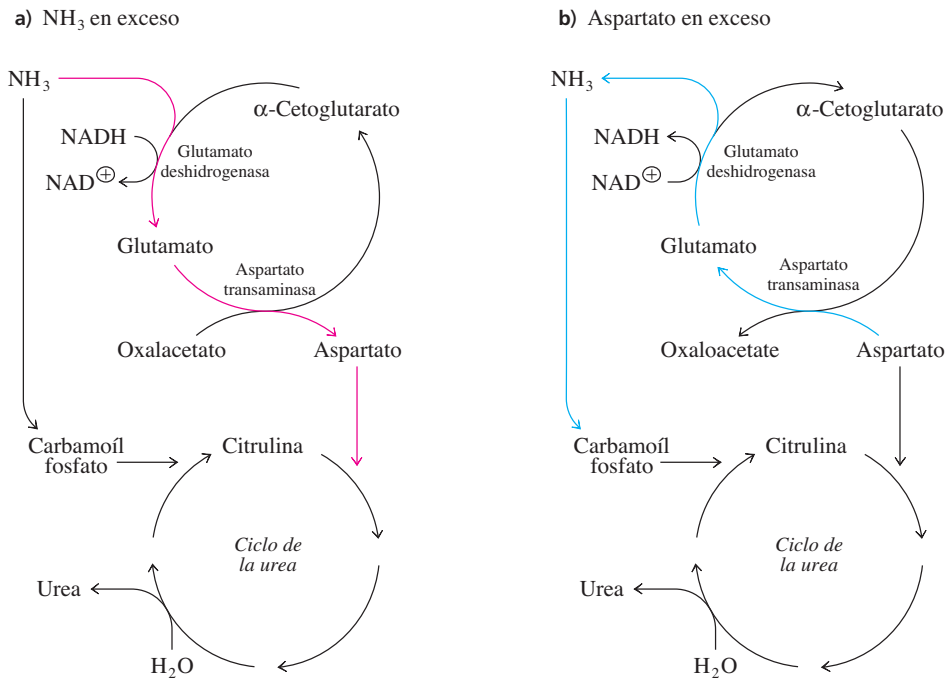
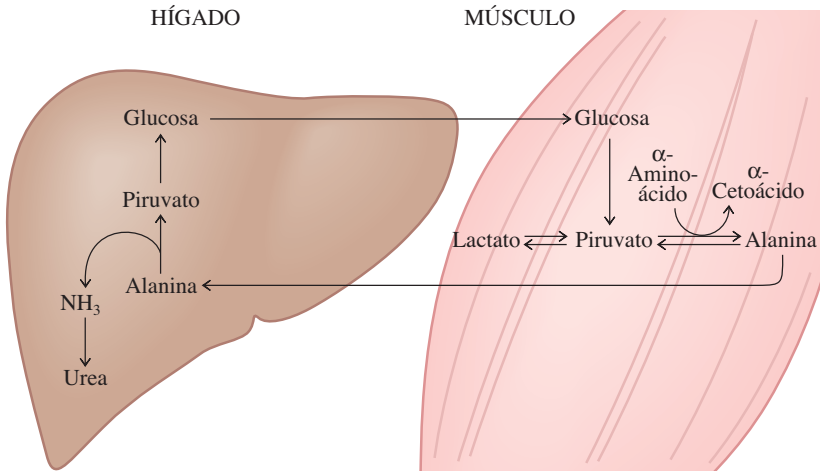


Figura 17.40 ▲
Balanceo del suministro de nitrógeno para el ciclo de la urea. Se describen dos situaciones teóricas: **a)** NH_3 en exceso extremo y **b)** aspartato en exceso extremo. El flujo por las reacciones casi en equilibrio, catalizadas por glutamato deshidrogenasa y aspartato transaminasa se invierte, dependiendo de las cantidades relativas de amoniaco y aminoácidos.



◀Figura 17.41
Ciclo de glucosa-alanina.

17.8 Producción de bicarbonato en el metabolismo renal de glutamina

Con frecuencia, el organismo produce ácidos como compuestos metabólicos finales; los aniones que resultan son eliminados en la orina, y los protones se quedan en el organismo. Un ejemplo es el ácido β-hidroxibutírico (un cuerpo cetónico), que se produce en cantidades masivas durante la diabetes mellitus no controlada. Otro ejemplo es el ácido sulfúrico producido durante el catabolismo del metabolismo de cisteína y metionina, aminoácidos sulfurados. Estos metabolitos ácidos se disocian para dar

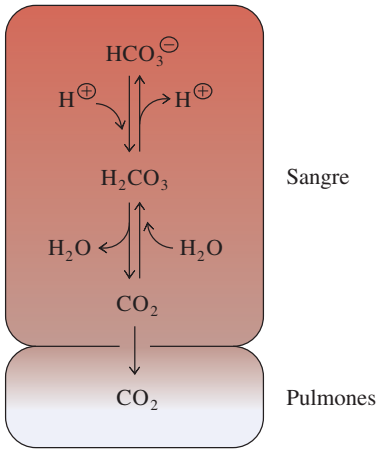


Figura 17.42 ▲
Regulación de $H^{\oplus}$ en la sangre. El sistema regulador de $H^{\oplus}$ causa pérdida de bicarbonato.

protones y los aniones correspondientes, β-hidroxibutirato o sulfato (SO_4^{2-}). La sangre tiene un sistema regulador efectivo para los protones: reaccionan con bicarbonato para producir CO_2, que se elimina en los pulmones, y H_2O (figura 17.42). Si bien este sistema neutraliza en forma eficaz al exceso de iones hidrógeno, lo hace al costo de agotar el bicarbonato de la sangre. El bicarbonato se reabastece por el catabolismo de glutamina en los riñones.

En los riñones, los dos átomos de nitrógeno de la glutamina son eliminados por la acción consecutiva de glutaminasa y glutamato deshidrogenasa, para producir α-Cetoglutarato^{2-} y 2 $NH_4^{\oplus}$.

$$\text{Glutamina} \longrightarrow \longrightarrow \alpha\text{-Cetoglutarato}^{2-} + 2\ NH_4^{\oplus} \qquad \textbf{(17.6)}$$

Las dos moléculas del anión α-cetoglutarato divalente se pueden convertir en una molécula de glucosa neutra y cuatro moléculas de bicarbonato. El α-cetoglutarato se convierte en glucosa por oxidación a oxaloacetato, que lleva a la gluconeogénesis. El proceso total (sin tener en cuenta la intervención de ATP) es

$$\underset{\text{Glutamina}}{2\ C_5H_{10}N_2O_3} + 3\ O_2 + 6\ H_2O \longrightarrow$$

$$\underset{\text{Glucosa}}{C_6H_{12}O_6} + 4\ HCO_3^{\ominus} + 4\ NH_4^{\oplus} \qquad \textbf{(17.7)}$$

El $NH_4^{\oplus}$ es excretado en la orina, y el $HCO_3^{\ominus}$ se agrega a la sangre venosa, sustituyendo al bicarbonato perdido en la regulación de los ácidos metabólicos. El $NH_4^{\oplus}$ excretado se acompaña, en la orina, por el anión del metabolito ácido original (por ejemplo, β-hidroxibutirato).

Resumen

1. Sólo unas pocas especies de bacterias y algas azul-verdes fijan nitrógeno por reducción de N_2 atmosférico a amoniaco, catalizada por nitrogenasa. Las plantas y los microorganismos pueden reducir el nitrato y el nitrito a amoniaco.
2. El amoniaco se asimila en metabolitos por aminación reductora de α-cetoglutarato a glutamato, catalizada por glutamato deshidrogenasa. La glutamina, donador de nitrógeno en muchas reacciones de biosíntesis, se forma a partir de glutamato y amoniaco, por acción de glutamina sintetasa.
3. El grupo amino del glutamato se puede transferir a un α-cetoácido, en una reacción reversible de transaminación, y formar α-cetoglutarato y el α-aminoácido correspondiente.
4. Las rutas de biosíntesis de esqueletos de carbono en los aminoácidos comienzan con precursores metabólicos simples, como piruvato y compuestos intermedios en el ciclo del ácido cítrico.
5. Los aminoácidos no esenciales son aquellos que pueden producir los animales en cantidades suficientes para su crecimiento. Esos aminoácidos se forman en general mediante rutas cortas, poco costosas en energía. Los aminoácidos esenciales deben suministrarse en las dietas de los animales; esos aminoácidos son sintetizados por bacterias y plantas.
6. Además de su papel en la síntesis de proteínas, los aminoácidos son precursores en varias otras rutas metabólicas.
7. Las moléculas de proteína en todas las células vivas se sintetizan y degradan en forma constante.
8. Los aminoácidos obtenidos en la degradación de proteínas o en forma directa de los alimentos se pueden catabolizar. El catabolismo comienza, con frecuencia, con desaminación, seguida por modificación de las cadenas restantes de carbono, para entrar a las rutas centrales del metabolismo de carbono.
9. Las rutas de degradación de aminoácidos conducen a piruvato, acetil-CoA o a compuestos intermedios en el ciclo del ácido cítrico. Los aminoácidos que se degradan a compuestos intermedios en el ciclo del ácido cítrico son glicogénicos. Los que forman acetil-CoA son cetogénicos.
10. En los mamíferos, la mayor parte del nitrógeno se excreta como urea, que se forma en el ciclo de la urea en el hígado. El átomo de carbono de la urea se deriva del bicarbonato. Un grupo amino se deriva del amoniaco y el otro del aspartato.
11. El metabolismo de glutamato en los riñones produce el bicarbonato necesario para neutralizar los ácidos producidos en el organismo.

Problemas

1. En los heterocistos de las cianobacterias hay altas concentraciones de nitrogenasa. Estas células han conservado PSI, pero no contienen PSII. ¿Por qué?

2. Escriba la ecuación neta de la conversión de una molécula de α-cetobutirato en una de glutamina, asimilando dos moléculas de amoniaco en las siguientes reacciones acopladas: *a)* glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa y *b)* glutamina sintetasa y glutamato sintasa. Compare las necesidades de energía de las dos rutas, y explique cualquier diferencia.

3. Cuando se alimenta aspartato marcado con ^{15}N a animales, la marca de ^{15}N aparece rápidamente en muchos aminoácidos. Explique esta observación.

4. *a*) Tres de los 20 aminoácidos comunes son sintetizados por transaminación simple de metabolitos de carbohidrato. Escriba las ecuaciones de esas tres reacciones de transaminación.

b) Uno de los aminoácidos se puede sintetizar por aminación reductora de un metabolito de carbohidrato. Escriba la ecuación de esta reacción.

5. Los animales recurren a las plantas o a los microorganismos para incorporar azufre en aminoácidos y sus derivados. Sin embargo, la metionina es un aminoácido esencial en los animales, en tanto que la cisteína no lo es. Si el donante de un átomo de azufre en la conversión de homoserina en homocisteína en las plantas es cisteína, describa la ruta general por la que se incorpora azufre en cisteína y metionina en las plantas, y a cisteína en los animales.

6. La serina es una fuente de fragmentos de un carbono para ciertas rutas de biosíntesis.

a) Escriba las ecuaciones que muestren cómo se ponen a disposición para la biosíntesis dos átomos de carbono de la serina.

b) Suponiendo que el precursor de la serina se produce en la glicólisis, ¿cuáles átomos de carbono, en último término, de la glucosa son los precursores de esos fragmentos de un carbono?

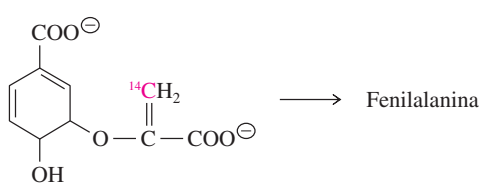
7. Indique dónde aparece la marca en el producto de cada uno de los pares precursor-producto siguientes:

a) 3-[^{14}C]-Oxalacetato ⟶ Treonina

b) 3-[^{14}C]-Fosfoglicerato ⟶ Triptófano

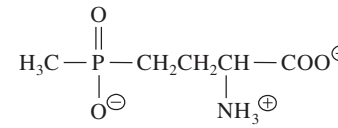
c) 3-[^{14}C]-Glutamato ⟶ Prolina

d)



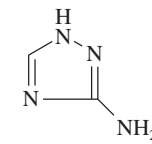
Corismato

8. *a*) El PPT (fosfinotricina) es un herbicida relativamente inocuo para los animales, porque no se transporta de la sangre al cerebro, y se elimina rápidamente por los riñones de los animales. El PPT inhibe eficazmente una enzima en el metabolismo de aminoácidos en las plantas, porque es un análogo del aminoácido sustrato. ¿A qué aminoácido se parece el PPT?



PPT

b) El herbicida aminotriazol inhibe a la imidazol glicerol fosfato deshidrogenasa. ¿Qué ruta de aminoácidos se inhibe en las plantas?



Aminotriazol

9. Los niños con fenilcetonuria no deben consumir aspartame, el edulcorante artificial (figura 3.10). ¿Por qué?

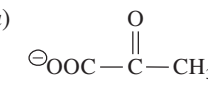
10. *a*) Una deficiencia de α-cetoácido deshidrogenasa es la anormalidad enzimática más común en el catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada, y las personas con esta enfermedad excretan α-cetoácidos de cadena ramificada. Escriba la estructura de los α-cetoácidos que se formarían durante el catabolismo de leucina, valina e isoleucina, cuando esta enzima es defectuosa.

b) Una alteración del catabolismo de aminoácidos se debe a la acumulación y excreción de sacaropina. ¿Qué ruta de aminoácido se afecta y qué enzima es la defectuosa?

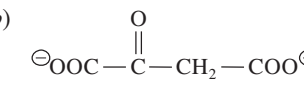
c) La citrulinemia se caracteriza por acumulación de citrulina en la sangre y su excreción en la orina. ¿Qué ruta metabólica se afecta y de cuál enzima es la deficiencia en esta enfermedad?

11. ¿Qué aminoácidos producen los siguientes α-cetoácidos por transaminación?

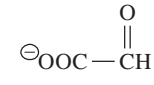
a)



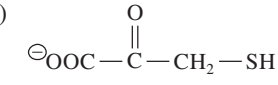
b)



c)



d)



12. En los músculos de animales se usan dos mecanismos para eliminar el exceso de nitrógeno generado durante la desaminación de los aminoácidos. ¿Cuáles son las dos rutas y por qué son necesarias?

13. La tiocitrulina y la *S*-metiltiocitrulina evitan la dilatación de vasos sanguíneos, baja presión sanguínea y choque, todos inducidos experimentalmente en animales. ¿Qué enzima que produce un mensajero dilatador de vasos sanguíneos es la que se inhibe? Sugiera por qué esas dos moléculas podrían ser inhibidores de esta enzima.

14. ¿Quién ganó el Premio Nobel de Química en 2004 y por qué tiene importancia para lo que se explica en este capítulo? [**http://nobelprize.org/**]

15. ¿Por qué hay tan pocas enfermedades metabólicas relacionadas con defectos en la biosíntesis de aminoácidos?

16. En este capítulo no se describen rutas de biosíntesis para los aminoácidos números 21 y 22 (sección 3.3). ¿Por qué no? ¿Cuáles son los precursores inmediatos de esos dos aminoácidos adicionales?

17. El costo de fabricar aminoácidos en términos de equivalentes de ATP se puede calcular usando valores del costo de obtener cada uno de los precursores, más el costo de cada reacción en la ruta de biosíntesis de aminoácido. Suponiendo que el costo de fabricación del gliceraldehído 3-fosfato sea 24 equivalentes de ATP (sección 15.4C), calcule el costo de obtener serina (figura 17.14) y alanina (figura 17.12). ¿Cómo se comparan los valores que obtuvo con los de la tabla 17.3?

Lecturas seleccionadas

Ciclo del nitrógeno

Howard, J. B. y Rees, D. C. (1994). Nitrogenase: a nucleotide-dependent molecular switch. *Annu. Rev. Biochem.* 63:325-264. Describe las estructuras y propiedades de las proteínas nitrogenasas.

Montoya, J. P., Holl, C. M., Zehr, J. P., Hansen, A., Villareal, T. A. y Capone, D. G. (2004). High rates of N_2 fixation by unicellular diazotrophs in the oligotrophic Pacific Ocean. *Nature* 430: 1027-1031.

Schimpl, J., Petrilli, H. M. y Blöchl, P. E. (2003). Nitrogen binding to the FeMo-cofactor of nitrogenase. *J. Am. Chem. Soc.* 125:15772-15778.

Schindelin, H., Kisker, C., Schelssman, J. L., Howard, J. B. y Rees, D. C. (1997). Structure of ADP. $AlF_4^{\ominus}$-stabilized nitrogenase complex and its implications for signal transduction. *Nature* 387:370-376. Describe la estructura de un complejo de la Fe-proteína y la MoF-proteína con un análogo de estado de transición.

Metabolismo de aminoácidos

Fitzpatrick, P. F. (1999). Tetrahydroproterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annu. Rev. Biochem.* 68:355-381. Describe la hidroxilacion de fenilalanina, tirosina y triptófano.

Häussinger, D. (1998). Hepatic glutamine transport and metabolism. *Ad. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 72:43-86. Describe el metabolismo de glutamina en el hígado de mamíferos.

Hayashi, H., Wada, H., Yoshimura, T., Esaki, N. y Soda, K. (1990). Recent topics in pyridoxal 5′-phosphate enzyme studies. *Annu. Rev. Biochem.* 59:87-110.

Huang, X., Holden, H. M. y Raushel, F. M. (2001). Channeling of substrates and intermediates in enzyme-catalyzed reactions. *Annu. Rev. Biochem.* 70:149-180.

Katagiri, M. y Nakamura, M. (2003). Reappraisal of the 20th-century version of amino acid metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 312:205-208.

Levy, H. L. (1999). Phenylketonuria: old disease, new approach to treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:1811-1813.

Perham, R. N. (2000). Swinging arms and swinging domains in multifunctional enzymes: catalytic machines for multistep reactions. *Annu. Rev. Biochem.* 69:961-1004.

Purich, D. L. (1998). Advances in the enzymology of glutamine synthesis. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 72:9-42.

Raushel, F. M., Thoden, J. B. y Holden, H. M. (2003). Enzymes with molecular tunnels. *Acc. Chem. Res.* 36:539-548.

Scapin, G. y Blanchard, J. S. (1998). Enzymology of bacterial lysine biosynthesis. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 72:279-324.

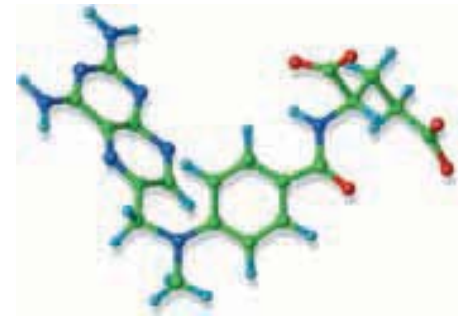
Scriver, C. R., Beaudet, A. L, Sly, W. S. y Valle, D., eds. (1995). *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, Vols. 1, 2 y 3. New York: McGraw-Hill). Describe cientos de enfermedades metabólicas, incluyendo muchas donde intervienen enzimas relacionadas con aminoácidos, y las explica mediante genética molecular.

Wu, G. y Morris, S. M. Jr. (1998). Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.* 336:1-17. Describe el metabolismo de arginina en los mamíferos.

Zalkin, H. y Smith, J. L. (1998). Enzymes utilizing glutamine as an amide donor. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 72:87-144.

18

capítulo dieciocho



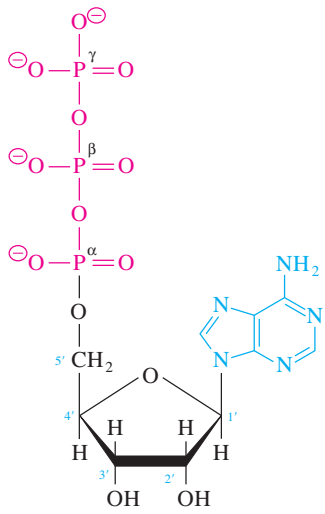
Metabolismo de nucleótidos

En este libro se han encontrado los nucleótidos y sus componentes. Es probable que se conozcan más los nucleótidos por ser las unidades constructivas del ADN y del ARN. Sin embargo, como hemos visto, intervienen en casi todas las actividades de las células, solos o en combinación con otras moléculas. Algunos nucleótidos (como el ATP) funcionan como cosustratos, y otros (como AMP cíclico y GTP) son compuestos reguladores.

Uno de los componentes de todos los nucleótidos es una base de purina o pirimidina. Los demás componentes son un azúcar de cinco carbonos, ribosa o desoxirribosa, y uno o más grupos fosforilo. Dentro de las células, las bases normales (adenina, guanina, citosina, timina y uracilo) casi siempre se encuentran como cosustituyentes de los nucleótidos y polinucleótidos. Todos los organismos y células pueden sintetizar nucleótidos de purina y pirimidina, porque esas moléculas son esenciales para el flujo de información. En las células que no se dividen, la biosíntesis de los nucleótidos se dedica casi en exclusiva a la producción de los ribonucleótidos para síntesis del ARN y diversos cofactores nucleotídicos. Los desoxirribonucleótidos se necesitan para la replicación del ADN en las células en división. Ya que la síntesis de los desoxinucleótidos se relaciona estrechamente con la división celular, su estudio tiene especial importancia para la medicina moderna; varias sustancias sintéticas que inhiben su síntesis se usan como agentes terapéuticos contra el cáncer.

En este capítulo se describirá primero la biosíntesis *de novo*, es decir, "nueva a partir de elementos simples", de nucleótidos de pirimidina y de purina. A continuación se presentará la conversión de los ribonucleótidos de pirimidina y purina en sus formas de 2′-desoxi, formas que se incorporan al ADN. Después se describirá la forma de obtener las purinas y las pirimidinas intracelularmente, por la descomposición de los ácidos nucleicos, o extracelularmente a partir del alimento, y pueden incorporarse en forma directa a los nucleótidos en un proceso llamado salvamento o recuperación. Las rutas de conservación ahorran energía porque reciclan los productos de descomposición de los ácidos nucleicos. Por último, se examinará la degradación biológica de los nucleótidos. La descomposición de las purinas lleva a la formación de compuestos potencialmente tóxicos que se excretan, en tanto que la descomposición de las pirimidinas termina en productos que se metabolizan con facilidad.

Arriba: Metotrexato, uno de los medicamentos que más se usan contra el cáncer. El metotrexato es análogo del folato, que inhibe el ciclo de reacciones que generan desoxitimidilato para la síntesis de ADN.



▲Estructura de la adenosina trifosfato (ATP). La base nitrogenada adenina (en gris claro) está unida a ribosa (en negro). Tres grupos fosforilo (en gris oscuro) están unidos a la ribosa en la posición 5′.

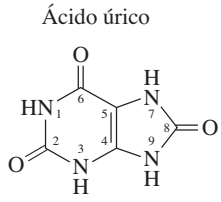


Figura 18.1 ▲
Ácido úrico.

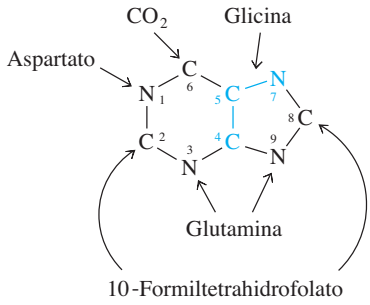


Figura 18.2 ▲
Fuentes de los átomos de anillo de las purinas sintetizadas *de novo*.

18.1 Síntesis de los nucleótidos de purina

La identificación de las enzimas y los productos intermedios de la ruta de síntesis de adenosina 5′-monofosfato (AMP) y guanosina 5′-monofosfato (GMP), que son nucleótidos de purina, comenzó con los estudios del metabolismo del nitrógeno en las aves. En ellas, y en algunos reptiles, el producto final del metabolismo del nitrógeno es la purina ácido úrico (figura 18.1), y no urea, como en los mamíferos. En la década de 1950, se descubrió que el ácido úrico y las purinas del ácido nucleico se originan de los mismos precursores y con la misma secuencia de reacciones. Homogenizados de hígado de paloma, tejido donde se sintetizan activamente las purinas, fueron una fuente cómoda de enzimas para estudiar los pasos de la biosíntesis de las purinas. Desde entonces se ha encontrado en muchos otros organismos la ruta en hígado aviario.

Cuando se administraron a palomas y ratas compuestos marcados isotópicamente, como $^{13}CO_2$, $H^{13}COO^{\ominus}$ (formato) y $^{\oplus}H_3N{-}CH_2{-}{}^{13}COO^{\ominus}$ (glicina), excretaron ácido úrico marcado. El ácido úrico se aisló y se degradó en forma química para identificar las posiciones de los átomos de carbono y de nitrógeno. El carbono del dióxido de carbono se incorporó al C-6, y el carbono del formato en el C-2 y el C-8 de las purinas. Se demostró que, en último término, las fuentes de los átomos del anillo son aspartato para el N-1, formato para el C-2 y C-8, por vía del 10-formiltetrahidrofolato (sección 7.10); grupos amida de la glutamina para el N-3 y N-9; glicina para el C-4, C-5 y N-7, y dióxido de carbono para el C-6. Estos hallazgos se resumen en la figura 18.2.

La estructura anular de la purina no se sintetiza como base libre, sino como sustituyente de la ribosa 5-fosfato. La ribosa 5-fosfato para la biosíntesis de las purinas proviene del 5-fosforribosil 1-pirofosfato (PRPP). El PRPP se sintetiza a partir de la ribosa 5-fosfato y ATP, en una reacción catalizada por la PRPP sintetasa (figura 18.3); a continuación el PRPP dona la ribosa 5-fosfato que sirve como la base sobre la que se construye la estructura de la purina. También el PRPP es precursor en la biosíntesis de nucleótidos de pirimidina, aunque en esa ruta reacciona con una pirimidina ya formada y produce un nucleótido. También el PRPP se usa en las rutas de recuperación de nucleótidos y en la biosíntesis de la histidina (figura 17.22).

El producto inicial de la ruta biosintética de los nucleótidos de purina es la inosina 5′-monofosfato (IMP, o inosinato) (figura 18.4), nucleótido que contiene hipoxantina o 6-oxopurina como su base. La ruta de 10 pasos para la síntesis de IMP *de novo* fue descubierta en la década de 1950 por los grupos de investigación de John M. Buchanan y G. Robert Greenberg. Los difíciles aislamientos y caracterizaciones estructurales de los compuestos intermedios tardaron unos 10 años.

La ruta al IMP se ve en la figura 18.5, en la página 560. Comienza con el desplazamiento del grupo pirofosforilo del PRPP por el nitrógeno de amida en la glutamina, en una reacción catalizada por la glutamina-PRPP amidotransferasa. Nótese que la configuración del carbono anomérico se invierte de α a β en este desplazamiento nucleofílico; la configuración β persiste en los nucleótidos completados de purina. El grupo amino del producto, fosforribosilamina, se acila entonces por la glicina, y forma glicinamida ribonucleótido. El mecanismo de esta reacción, donde se forma un fosfato de glicilo unido a enzima, se parece al de la glutamina sintetasa, que tiene un γ-glutamil fosfato como compuesto intermedio (ecuación 10.17).

El paso 3 consiste en la transferencia de un grupo formilo del 10-formiltetrahidrofolato al grupo amino destinado a transformarse en el N-7 del IMP. En el paso 4 se convierte una amida en amidina $(RHN{-}C{=}NH)$ en una reacción dependiente de ATP, donde la glutamina es el donador del nitrógeno. El paso 5 es una reacción de cerramiento de anillo que requiere ATP y produce un derivado de imidazol. En el paso 6 se incorpora CO_2 fijándose al carbono que se vuelve el C-5 del IMP. Esta carboxilación es rara, porque no requiere biotina. Primero se fija bicarbonato en un paso dependiente de ATP al grupo amino que va a ser el N-3 del IMP. El compuesto intermedio carboxilado tiene

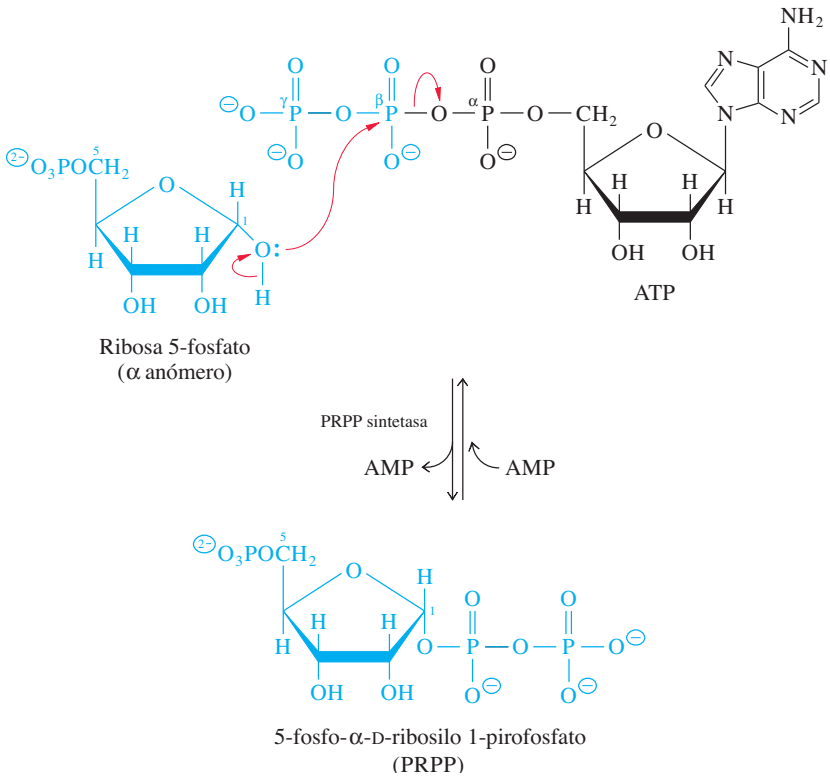
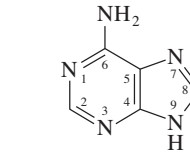
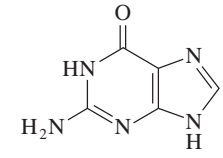


Figura 18.3 ▲
Síntesis del 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) a partir de la ribosa 5-fosfato y ATP. La PRPP sintetasa cataliza la transferencia de un grupo pirofosforilo de ATP al oxígeno en el 1-hidroxilo de la ribosa 5-fosfato.

LAS PRINCIPALES PURINAS



Adenina
(6-Aminopurina)



Guanina
(2-Amino-6-oxopurina)

▲Adenina, guanina

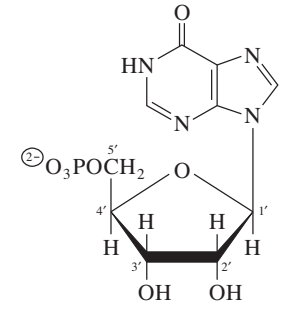


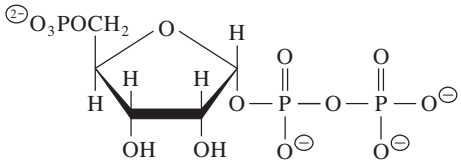
Figura 18.4 ▲
Inosina 5′-monofosfato (IMP o inosinato). La IMP se convierte en otros nucleótidos de purina. En las aves, mucho del IMP se degrada a ácido úrico.

entonces un rearreglo donde se transfiere el grupo carboxilato al átomo de carbono que será el C-5 del anillo de purina (figura 18.6, página 561). En *Escherichia coli*, estos pasos son catalizados por dos proteínas. En los eucariotas son catalizados por una enzima multifuncional.

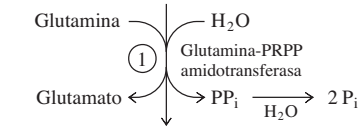
El grupo amino del aspartato se incorpora al sistema anular de la purina en crecimiento, en los pasos 7 y 8. Primero se condensa el aspartato con el grupo carboxilato recién agregado, para formar una amida, una succinilcarboxamida, en forma específica. Después la adenilosuccinato liasa cataliza una reacción de ruptura no hidrolítica que libera fumarato. Este proceso de dos pasos da como resultado la transferencia de un grupo amino que contiene el nitrógeno destinado a ser el N-1 del IMP. Los dos pasos se parecen a los pasos 2 y 3 del ciclo de la urea (figura 17.39), pero en este caso se escinde el ATP en ADP + P_i, y no en AMP + PP_i.

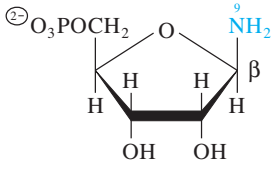
En el paso 9, que se parece al paso 3, el 10-formiltetrahidrofolato dona un grupo formilo ($-CH=O$) al grupo amino nucleofílico del aminoimidazol carboxamida ribonucleótido. El nitrógeno de la amida en el último producto intermedio se condensa entonces con el grupo formilo, en un cerramiento de anillo que completa el sistema de anillos de purina del IMP.

La síntesis de IMP consume energía considerable. El ATP se convierte en AMP durante la síntesis del PRPP. También, los pasos 2, 4, 5, 6 y 7 son impulsados por la conversión de ATP en ADP. Se requiere ATP adicional para la síntesis de glutamina a partir de glutamato y amoniaco (figura 17.4).

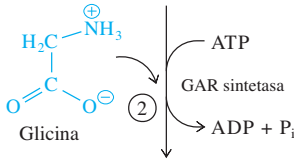


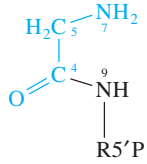
5-fosfo-α-D-ribosilo 1-pirofosfato (PRPP)



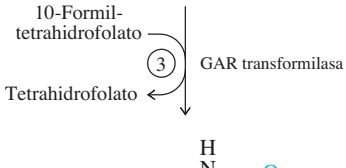


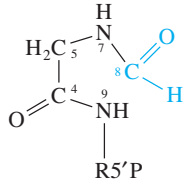
5-fosfo-β-D-ribosilamina (PRA)



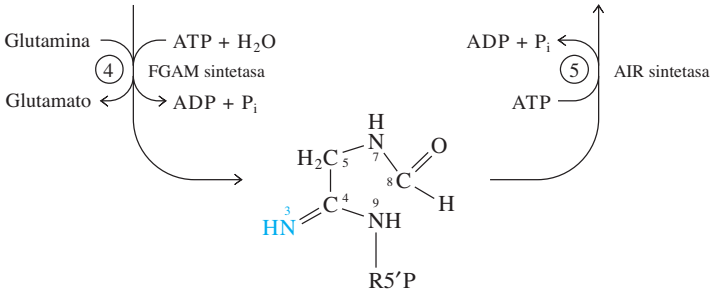


Glicinamida ribonucleótido (GAR)

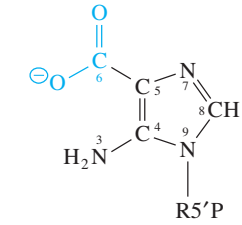


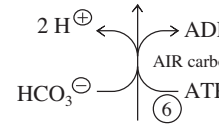


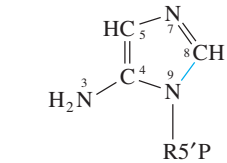
Formilglicinamida ribonucleótido (FGAR)



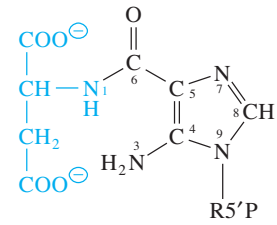
Formilglicinamidina ribonucleótido (FGAM)



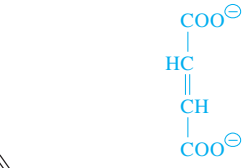


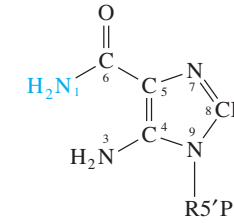


Aminoimidazol ribonucleótido (AIR)

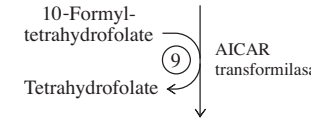


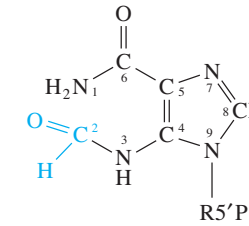
Aminoimidazol succinilocarboxamida ribonucleótido (SAICAR)



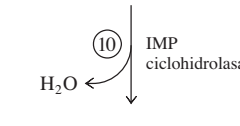


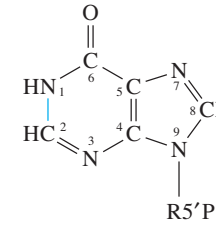
Aminoimidazol carboxamida ribonucleótido (AICAR)





Formamidoimidazol carboxamida ribonucleótido (FAICAR)





Inosina 5′-monofosfato (IMP)

◀ Figura 18.5
Ruta, en diez pasos, de la síntesis de la IMP. R5′P representa la ribosa 5′-fosfato. Los átomos se numeran de acuerdo con sus posiciones en la estructura completa de la purina.

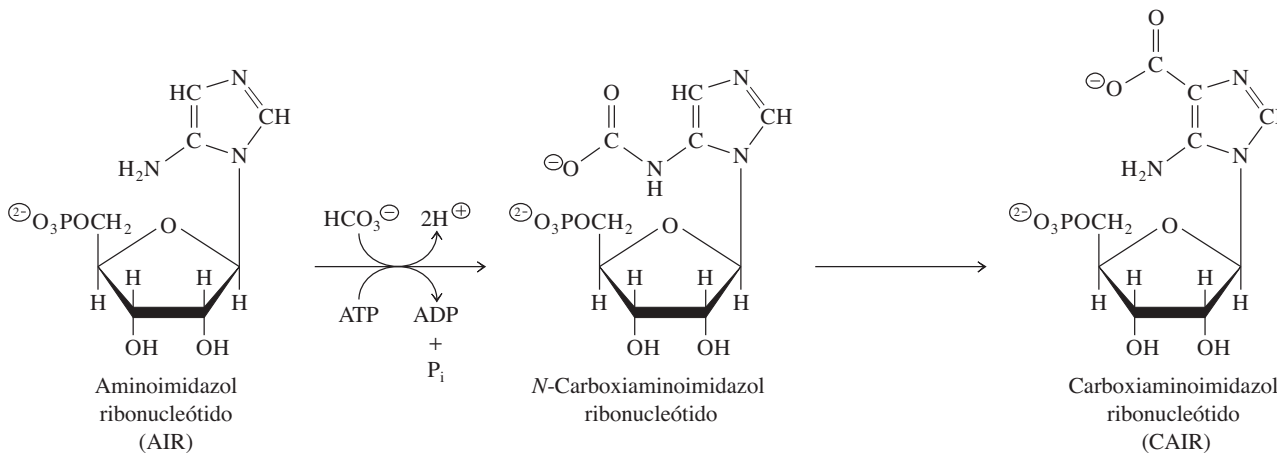


Figura 18.6 ▲
El carboxilaminoimidazol ribonucleótido es un compuesto intermedio en la conversión de AIR en CAIR.

18.2 Síntesis de otros nucleótidos de purina a partir de IMP

Se puede convertir IMP en AMP o GMP (figura 18.7, página siguiente). Se requieren dos reacciones enzimáticas para cada una de esas conversiones. La AMP y la GMP se pueden fosforilar entonces para formar sus difosfatos y trifosfatos, por acciones de nucleótido cinasas específicas (adenilato cinasa y guanilato cinasa, respectivamente) y la nucleósido difosfato cinasa, de amplia especificidad (sección 10.6).

Los dos pasos que convierten IMP en AMP se asemejan mucho a los pasos 7 y 8 en la biosíntesis de IMP. Primero, se condensa el grupo amino del aspartato con el grupo ceto del IMP en una reacción catalizada por la adenilosuccinato sintetasa, dependiente de GTP. Después, la eliminación del fumarato en el adenosilsuccinato es catalizada por la adenosilsuccinato liasa, la misma enzima que cataliza el paso 8 de la ruta a la IMP.

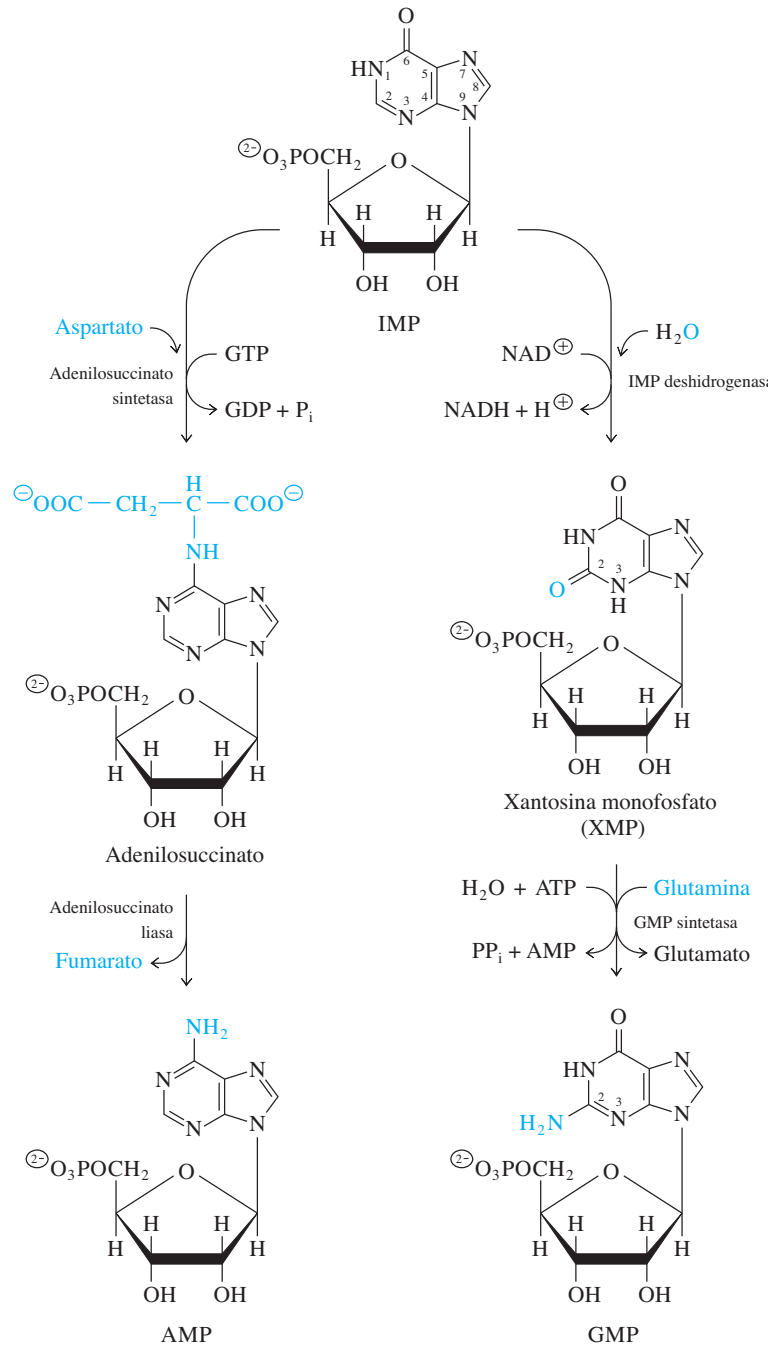
En la conversión de IMP a GMP, la IMP deshidrogenasa, dependiente de NAD^+, cataliza la oxidación del C-2. Esta reacción se efectúa por adición de una molécula de agua al doble enlace entre el C-2 y el N-3, seguida por la oxidación del hidrato. El producto de la oxidación es xantosina monofosfato (XMP). A continuación, en una reacción dependiente de ATP y catalizada por la GMP sintetasa, el nitrógeno de la amida en la glutamina reemplaza al oxígeno en el C-2 de la XMP. El uso de GTP como sustrato en la síntesis de AMP a partir de IMP, y de ATP en la síntesis de GMP a partir de IMP, ayuda a balancear la formación de los dos productos.

Es probable que la síntesis de nucleótidos de purina sea regulada en las células por inhibición de retroalimentación. Varias enzimas que catalizan pasos de la biosíntesis de nucleótidos de purina tienen comportamiento alostérico *in vitro*. La PRPP sintetasa es inhibida por varios ribonucleótidos de purina, pero sólo a mayores concentraciones que las que suele haber en la célula. El PRPP es el donador de ribosa 5-fosfato

RECUADRO 18.1 Nombres comunes de las bases

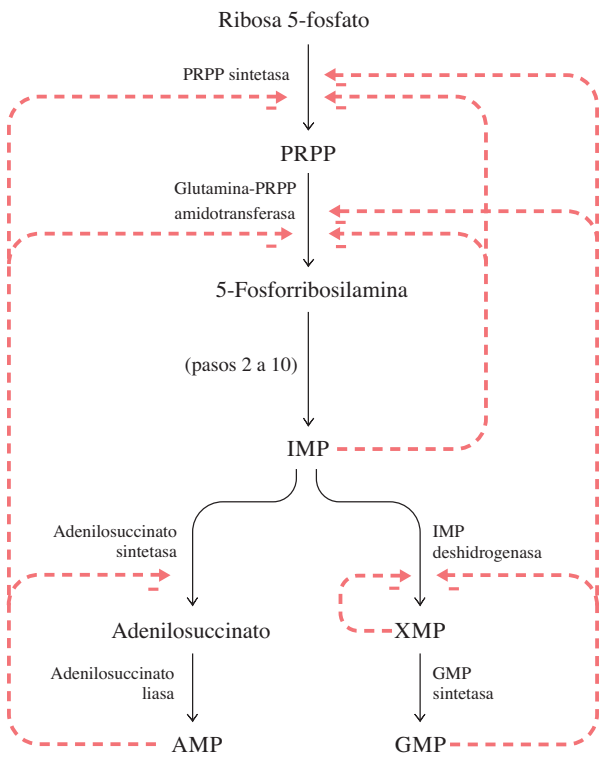
Adenina	de *adenas*, "glándula" en griego. Se aisló por primera vez de las glándulas pancreáticas (1885).	Uracilo	origen incierto; posiblemente de "urea" (1890).
Citosina	de *cyto-*, "receptáculo" en griego; se refiere a las células (1894).	Timina	se aisló por primera vez de las glándulas timo (1894).
Guanina	se aisló originalmente del "guano" o excremento de aves (1850)	Xantina	de "amarillo" en griego (1857).

Figura 18.7 ▶
Rutas para la conversión de IMP en AMP y en GMP.



en más de una docena de reacciones, por lo que cabe esperar que la síntesis del PRPP sea regulada en forma exclusiva por las concentraciones de los nucleótidos de purina. La enzima que cataliza el primer paso comprometido en la ruta de la síntesis de nucleótidos de purina, la glutamina-PRPP amidotransferasa (paso 1 en la figura 18.5), es inhibida alostéricamente por los productos finales del 5′-ribonucleótido (IMP, AMP y GMP) a las concentraciones intracelulares. Parece que este paso es el sitio principal de la regulación de esta ruta.

Las rutas que llevan de IMP a AMP y de IMP a GMP parecen estar reguladas también por inhibición de retroalimentación. La adenosilsuccinato sintetasa es inhibida *in vitro* por AMP, el producto de esta ramificación de dos pasos. Tanto XMP como GMP



◀Figura 18.8
Inhibición por retroalimentación en la biosíntesis de los nucleótidos de purina.

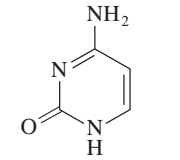
inhiben la IMP deshidrogenasa. La pauta de inhibición por retroalimentación en la síntesis de AMP y GMP se muestra en la figura 18.8. Los productos finales inhiben dos de los pasos iniciales comunes, igual que los pasos que salen del IMP en el punto de ramificación.

18.3 Síntesis de nucleótidos de pirimidina

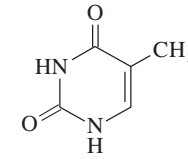
La uridina 5′-monofosfato (UMP) es el precursor de otros nucleótidos de pirimidina. La ruta de la biosíntesis de UMP es más simple que la de la purina, y consume menos moléculas de ATP. Los átomos del anillo de la pirimidina provienen del bicarbonato, que aporta el C-2, el grupo amida de la glutamina (N-3) y del aspartato, que aporta los átomos restantes (figura 18.9). El C-2 y el N-3 se incorporan después de formar el intermediario carbamoílo fosfato.

Se requiere el PRPP (fosforribosil 1-pirofosfato) para la biosíntesis de nucleótidos de pirimidina, pero el azúcar-fosfato del PRPP es cedido después de haberse formado el anillo; no entra a la ruta en el primer paso. Un compuesto con un anillo completo de pirimidina, el orotato (6-carboxiuracilo), reacciona con el PRPP para formar un ribonucleótido de pirimidina en el primer paso de la ruta de seis pasos.

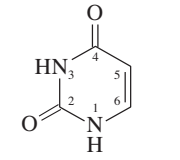
LAS PRINCIPALES PIRIMIDINAS



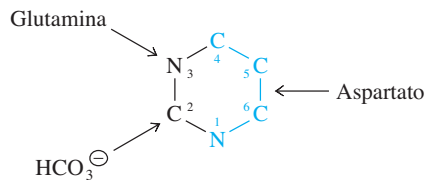
Citosina
(2-Oxo-4-aminopirimidina)



Timina
(2,4-dioxo-5-metilpirimidina)



Uracilo
(2,4-Dioxopirimidina)



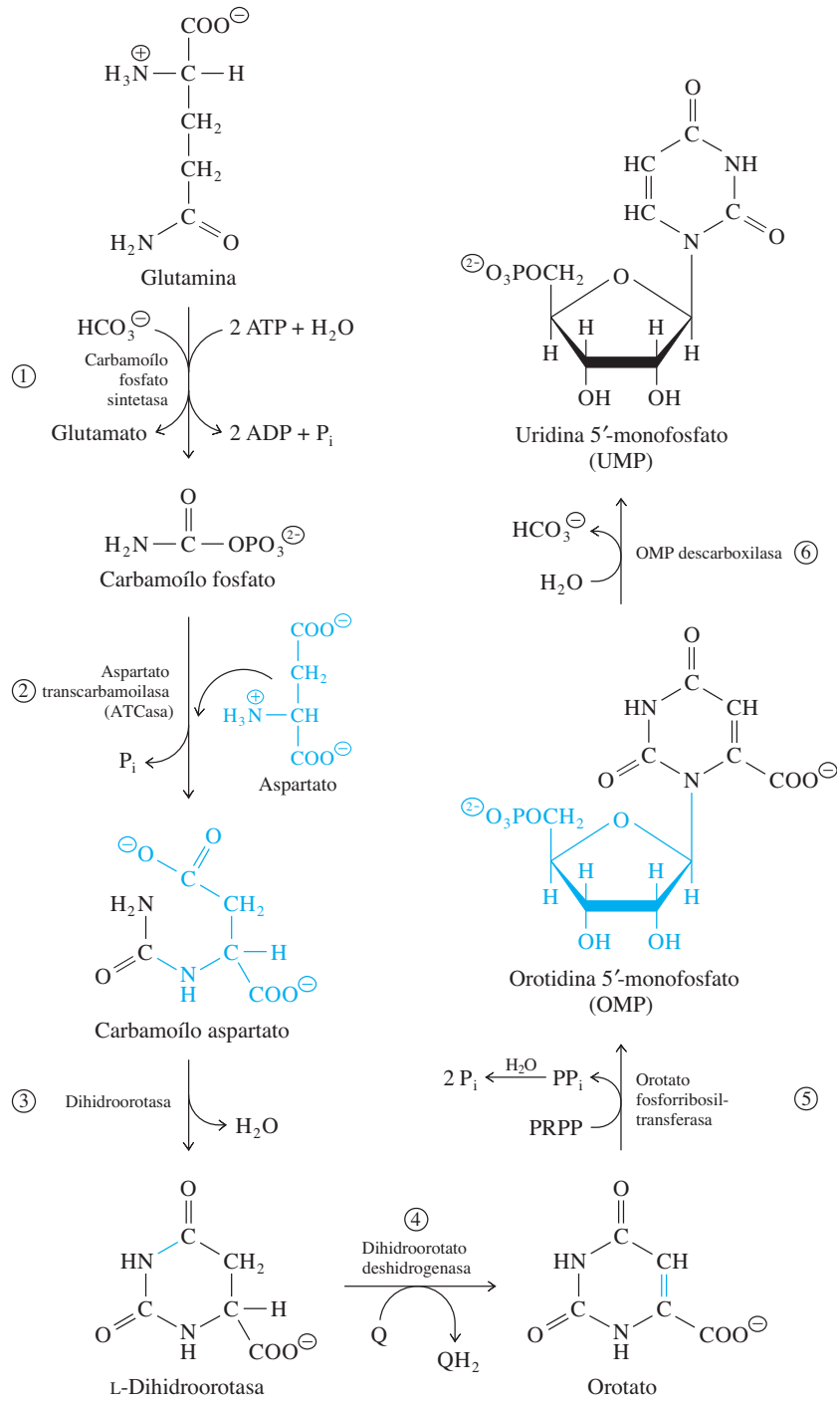
◀Figura 18.9
Fuentes de los átomos del anillo en las pirimidinas. El precursor inmediato del C-2 y del N-3 es el carbamoílo fosfato.

La orotidina 5′-monofosfato descarboxilasa (OMP descarboxilasa) es una de las enzimas más eficientes que se conocen (tabla 5.2).

A. La ruta de síntesis de pirimidina

La ruta de seis pasos para la síntesis de la pirimidina se muestra en la figura 18.10. Los dos primeros pasos generan un compuesto intermedio no cíclico que contiene todos los átomos destinados al anillo de la pirimidina. Este intermedio, aspartato de carbamoílo, forma un anillo mediante enzimas. El producto, dihidroorotato, se oxida entonces a orotato. A continuación el orotato se convierte en el ribonucleótido orotidina 5′-monofosfato

Figura 18.10 ▶
Ruta de seis pasos para la síntesis de UMP en procariotas. En los eucariotas, los pasos 1 a 3 son catalizados por una proteína multifuncional, llamada dihidroorotato sintasa, y los pasos 5 y 6 son catalizados por una enzima bifuncional, la UMP sintasa.

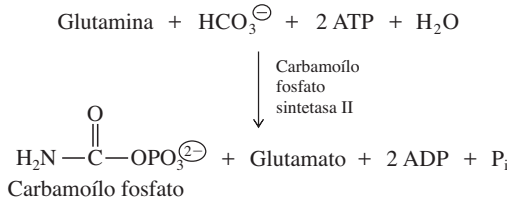


(OMP, u orotidilato), que sufre descarboxilación para formar UMP o uridilato. Este nucleótido de pirimidina es el precursor, no sólo de todos los demás ribonucleótidos de pirimidina, sino también de los desoxirribonucleótidos de pirimidina. Como se verá, las enzimas necesarias en la síntesis de la pirimidina se organizan y regulan de distinta forma en los procariotas y en los eucariotas.

El primer paso en la ruta de la biosíntesis de pirimidina es la formación de carbamoílo fosfato a partir del bicarbonato, el nitrógeno de la amida en la glutamina, y ATP. Esta reacción, catalizada por la carbamoílo fosfato sintetasa (por actividad de carbamoílo

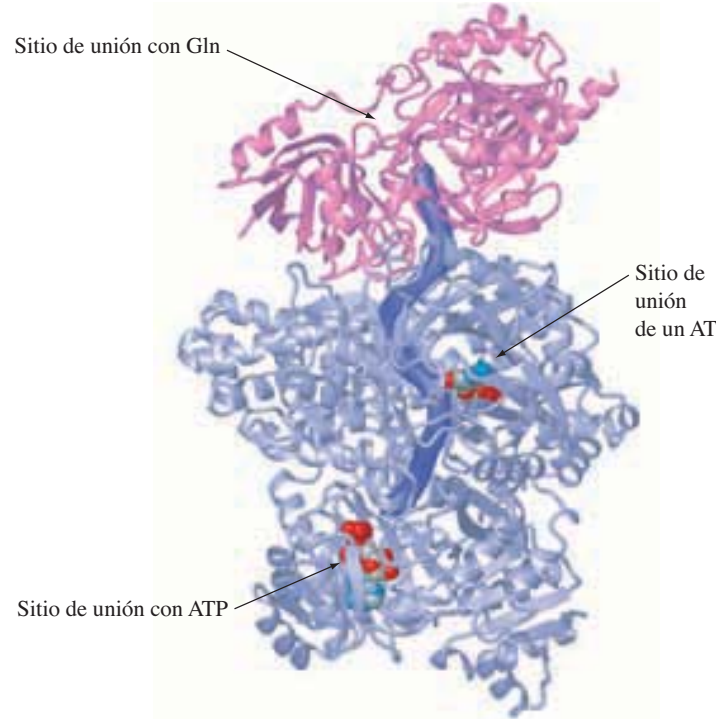
RECUADRO 18.2 Transferencia de amoniaco a partir de glutamina por algunas enzimas

Algunas enzimas que usan glutamina como donador de amida tienen un túnel molecular que atraviesa el interior de la proteína. Este es un ejemplo de canalización de metabolito (sección 5.11). La carbamoílo fosfato sintetasa de *E. coli* es la enzima más estudiada de ellas. Cataliza la síntesis de carbamoílo fosfato a partir de bicarbonato y glutamina:



El carbamoílo fosfato que se forma en esta reacción se usa en la síntesis de nucleótidos de pirimidina. (Una carbamoílo fosfato sintetasa diferente usa amoniaco y no glutamina como sustrato; se describe en la sección 17.7A.)

La carbamoílo fosfato sintetasa de *E. coli* es un heterodímero, con una subunidad pequeña y una grande (véase la figura). La síntesis de carbamoílo fosfato a partir de glutamina procede pasando por tres compuestos intermedios, cada uno formado en un sitio activo diferente. El ATP reacciona en dos de esos sitios. Los tres sitios están unidos por un túnel que va del sitio de unión con glutamina, donde se libera una molécula de amoniaco de la glutamina, al segundo sitio de unión con ATP, donde se carboxila el amoniaco, y por último al tercer sitio, donde se forma carbamoílo fosfato. El amoniaco, liberado de la glutamina en el sitio activo de la subunidad pequeña, no se equilibra con el solvente, sino baja por el túnel y tiene las reacciones que al final producen carbamoílo fosfato. Varios de los compuestos intermedios en la reacción total son bastante inestables, y el agua los degradaría si no estuvieran protegidos al estar en un túnel. Se necesita más investigación para determinar qué tan frecuente es esta estructura de túnel con varios dominios en las enzimas de metabolismo de glutamina.



Estructura de cinta de la carbamoílo fosfato sintetasa de *E. coli*. La subunidad pequeña (dominio *N*-terminal, púrpura) contiene el sitio activo para la hidrólisis de la glutamina, que libera NH_3. La unidad grande se muestra en azul. En su sitio de unión superior de ATP, el NH_3 se convierte en el intermediario inestable carbamato ($H_2N—COOH$), que se fosforila en el sitio de enlace con ATP C-terminal (inferior). A cada sitio de unión con ATP está unida una molécula de ADP. El túnel molecular que conecta a los tres sitios activos se indica con la barra azul. [PDP 1A9X]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

fosfato sintetasa II en células de mamíferos), requiere de dos moléculas de ATP, una para impulsar la formación del enlace C—N y la otra para donar un grupo fosforilo. Recuérdese que esta enzima no es la misma carbamoílo fosfato sintetasa que se usa en el ciclo de la urea. Esa enzima es la carbamoílo fosfato sintetasa I, y asimila amoniaco libre, en tanto que ésta (la carbamoílo fosfato sintetasa II en los animales) transfiere un grupo amino de la glutamina.

En el segundo paso de la biosíntesis de UMP, el grupo carbamoílo activado del carbamoílo fosfato se transfiere al aspartato para formar el carbamoílo aspartato. En esta reacción, catalizada por la aspartato transcarbamoilasa (ATCasa), el nitrógeno nucleofílico del aspartato ataca al grupo carbonilo del carbamoílo fosfato.

La dihidroorotasa cataliza el tercer paso de la biosíntesis de UMP, que es el cierre reversible del anillo de pirimidina (figura 18.10). El producto es el dihidroorotato, y a continuación se oxida por acción de la dihidroorotato deshidrogenasa para formar el orotato. En los eucariotas se produce el dihidroorotato en el citosol por los pasos 1 a 3. Entonces atraviesa la membrana mitocondrial externa antes de oxidarse a orotato por acción de la dihidroorotato deshidrogenasa asociada a la membrana interna mitocondrial. El sitio de unión del sustrato en esta enzima está en la superficie de la membrana interna mitocondrial. La enzima es una flavoproteína con hierro que cataliza la transferencia de electrones a la ubiquinona (Q), formando ubiquinol (QH_2). Los electrones del QH_2 se transfieren entonces al O_2 por la cadena de transporte de electrones.

Una vez formado, el orotato desplaza al grupo pirofosfato del PRPP, produciendo OMP en una reacción catalizada por la orotato fosforribosiltransferasa. La hidrólisis siguiente del pirofosfato hace que esta reacción sea esencialmente irreversible.

Por último se descarboxila el OMP para formar UMP en una reacción catalizada por la OMP descarboxilasa. En los eucariotas, el orotato producido en las mitocondrias pasa al citosol, donde se convierte en UMP. Una enzima bifuncional llamada UMP sintasa cataliza tanto la reacción de orotato con el PRPP para formar OMP, como la descarboxilación rápida de OMP a UMP.

En los mamíferos, los compuestos intermedios formados en los pasos 1 y 2 (carbamoílo fosfato y carbamoílo aspartato) y el OMP (del paso 5) por lo regular no pasan al solvente, sino que permanecen unidos a complejos enzimáticos y se canalizan a partir de un centro catalítico al siguiente. Varias proteínas multifuncionales, cada una catalizando varios pasos, también están en la ruta de la biosíntesis de los nucleótidos de purina en algunos organismos. La canalización de compuestos intermedios lábiles en las enzimas multifuncionales minimiza la degradación no deseada de ellos y mantiene así la especificidad de la reacción y ahorra energía.

B. Regulación de la síntesis de pirimidina

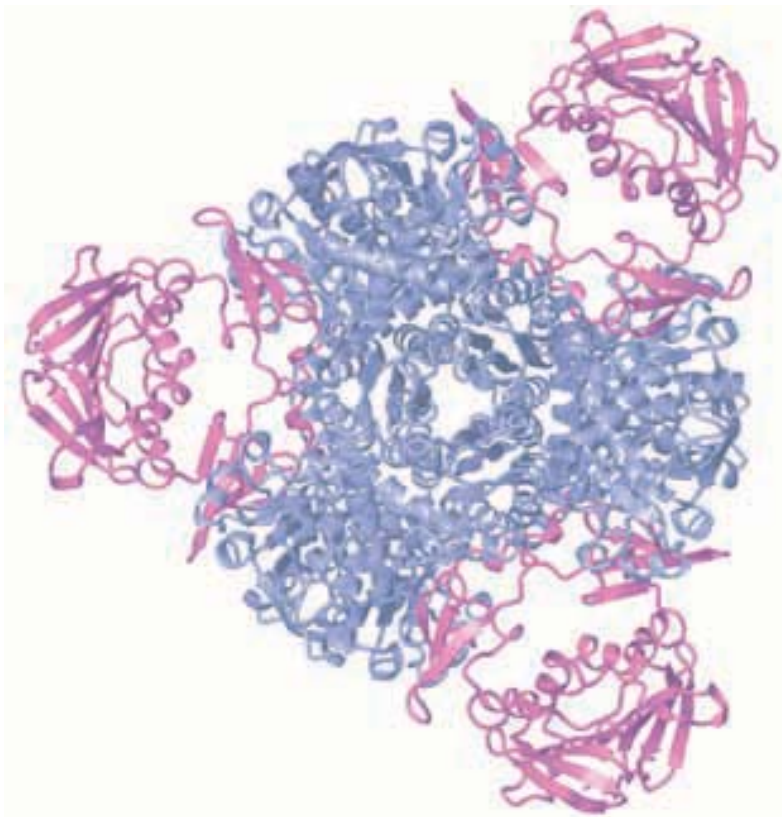
La regulación de la biosíntesis de pirimidina también es diferente en los procariotas y eucariotas. Aunque los seis pasos enzimáticos que llevan a UMP son iguales en los dos, las enzimas tienen una organización diferente en distintos organismos. En *Escherichia coli*, cada una de las seis reacciones es catalizada por una enzima separada. En los eucariotas, una proteína multifuncional en el citosol, llamada dihidroorotato sintasa, contiene sitios catalíticos separados (carbamoílo fosfato sintetasa II, ATCasa y dihidroorotasa) para los tres primeros pasos de la ruta.

Además de ser un intermedio en la síntesis de la pirimidina, el carbamoílo fosfato es un metabolito en la ruta de la biosíntesis de la arginina por vía de la citrulina (figura 17.39). En los procariotas se usa la misma carbamoílo fosfato sintetasa en las rutas de la biosíntesis de la pirimidina y la arginina. Esta enzima es inhibida alostéricamente por ribonucleótidos de pirimidina, como UMP, producto de la ruta de la biosíntesis de pirimidina. Se activa por la L-ornitina, precursor de la citrulina, y por nucleótidos de purina, los sustratos (junto con los nucleótidos de pirimidina) de la síntesis de los ácidos nucleicos. La carbamoílo fosfato sintetasa II eucariótica está regulada alostéricamente. El PRPP y la IMP activan la enzima, y varios nucleótidos de pirimidina la inhiben.

La siguiente enzima de la ruta es la aspartato transcarbamoilasa (ATCasa). La ATCasa de *E. coli* es la enzima alostérica que se ha estudiado con más detalle. Ya que el fosfato de carbamoílo puede entrar a rutas que lleven ya sea a pirimidinas o a la arginina en las bacterias, la ATCasa cataliza el primer paso comprometido en la biosíntesis de pirimidina. Esta enzima es inhibida por nucleótidos de pirimidina, y activada *in vitro* por ATP. La ATCasa en *E. coli* sólo se inhibe parcialmente (50 a 70%) por CTP, que es el inhibidor más potente, pero la inhibición puede ser casi total cuando hay presentes CTP y UTP al mismo tiempo. La UTP sola no inhibe la enzima. Los controles alostéricos (inhibición por nucleótidos de pirimidina y activación por el nucleótido de purina ATP) son un medio para que la carbamoílo fosfato sintetasa y la ATCasa balanceen las reservas del nucleótido de pirimidina y nucleótido de purina en *E. coli*. La relación de las concentraciones de los dos tipos de moduladores alostéricos determina el grado de la actividad de la ATCasa.

La ATCasa de *E. coli* tiene una estructura compleja con los sitios de unión a sustratos y los moduladores alostéricos en subunidades separadas. La enzima contiene seis subunidades catalíticas arregladas en dos trímeros y seis subunidades reguladoras formando tres dímeros (figura 18.11). Cada subunidad de un trímero catalítico está conectada a una subunidad del otro trímero catalítico por un dímero regulador. Cuando una molécula de aspartato se une, en presencia de carbamoílo fosfato, las seis subunidades catalíticas cambian a una conformación que tiene mayor actividad.

La ATCasa eucariótica no se inhibe por retroalimentación. La regulación por inhibición de retroalimentación no es necesaria, porque se puede controlar la ruta de la pirimidina regulando la enzima anterior a la ATCasa, la carbamoílo fosfato sintetasa II. El sustrato de la ATCasa en los eucariotas no es un metabolito de punto de ramificación; la síntesis del carbamoílo fosfato y la citrulina para el ciclo de la urea suceden en las mitocondrias, y la síntesis de carbamoílo fosfato para pirimidinas está en el citosol. Las reservas de carbamoílo fosfato están separadas.



◀Figura 18.11
Estructura compleja de la ATCasa de *Escherichia coli*. Las subunidades reguladoras (púrpura) están unidas a un trímero central de las subunidades catalíticas (en azul). Dos de esos hexámeros se apilan uno con otro para crear la enzima completa con 12 subunidades. [PDB 9ATC]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

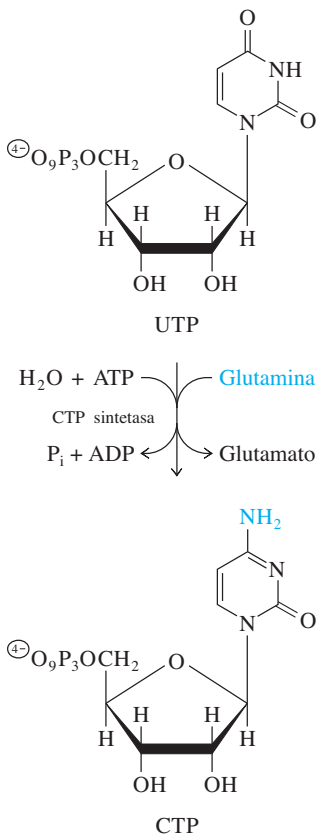
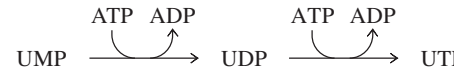


Figura 18.12 ▲
Conversión de UTP en CTP catalizada por la CTP sintetasa.

18.4 Síntesis de CTP a partir de UMP

La UMP se convierte en CTP en tres pasos. Primero, la uridilato cinasa (UMP cinasa) cataliza la transferencia del grupo γ-fosforilo de ATP a UMP para regenerar UDP, y entonces la nucleósido difosfato cinasa cataliza la transferencia del grupo γ-fosforilo de una segunda molécula de ATP a UDP, para formar UTP. En esas dos reacciones se convierten dos moléculas de ATP en dos moléculas de ADP.



(18.1)

Entonces, la CTP sintetasa cataliza la transferencia de la amida nitrógeno, dependiente de ATP, de la glutamina al C-4 de la UTP, formando CTP (figura 18.12). Esta reacción es químicamente análoga al paso 4 de la biosíntesis de purina (figura 18.5) y a la síntesis de GMP a partir de XMP, catalizada por la GMP sintetasa (figura 18.7).

La CTP sintetasa es inhibida alostéricamente por su producto, CTP, y en *E. coli* es activada en forma alostérica por GTP (figura 18.13). La regulación de la ATCasa y la CTP sintetasa balancea las concentraciones de nucleótidos de pirimidina endógenos. Concentraciones elevadas de CTP bloquean más la síntesis de CTP inhibiendo la CTP sintetasa. Bajo estas condiciones se desacelerará la síntesis de UMP, pero no se detendrá, ya que el CTP inhibe sólo en forma parcial a la ATCasa. La UMP se puede usar todavía en la síntesis del ARN y como precursor de dTTP (sección 18.6). Cuando las concentraciones de UTP y CTP son elevadas, la ATCasa se inhibe por completo. Las concentraciones elevadas de los nucleótidos de purina ATP y GTP aumentan las velocidades de síntesis de nucleótidos de pirimidina, lo cual ayuda a balancear las existencias de los nucleótidos de purina y pirimidina.

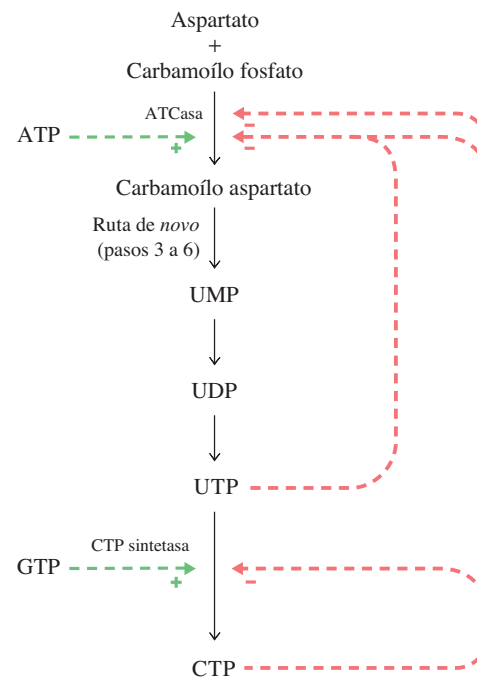


Figura 18.13 ▲
Regulación de la síntesis de los nucleótidos de pirimidina en *E. coli*. La regulación alostérica de la ATCasa y de la CTP sintetasa por los nucleótidos de pirimidina y de purina ayudan a balancear la síntesis de los nucleótidos.

18.5 Reducción de ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos

Los 2′-desoxirribonucleótido trifosfatos son sintetizados por reducción enzimática de los ribonucleótidos. En la mayor parte de los organismos esa reducción se efectúa a nivel del nucleósido difosfato. Peter Reichard y sus colegas demostraron que los cuatro ribonucleósido *di*fosfatos, ADP, GDP, CDP y UDP son sustratos de una sola ribonucleósido difosfato reductasa, estrechamente regulada. En algunos microorganismos, incluyendo especies de *Lactobacillus, Clostridium* y *Rhizobium*, los ribonucleósido *tri*fosfatos son los sustratos para la reducción por una reductasa dependiente de cobalamina. Ambos tipos de enzimas se llaman ribonucleótido reductasa, aunque los nombres más precisos son ribonucleósido difosfato reductasa y ribonucleósido trifosfato reductasa, respectivamente.

El NADPH (forma reducida del difosfato de nicotinamida adenina) proporciona el poder reductor para la síntesis de los desoxirribonucleósido difosfatos. Se reduce un puente de disulfuro en el sitio activo de la ribonucleótido reductasa y forma dos grupos tiol, que a su vez reducen el C-2′ de la parte de la ribosa en el sustrato nucleotídico mediante un mecanismo complejo de radical libre. Como se ve en la figura 18.14, los electrones se transfieren del NADPH a la ribonucleótido reductasa por la vía de la flavoproteína tiorredoxina reductasa, y la ditiol proteína coenzima tiorredoxina (figura 7.32). La tiorredoxina reductasa de los procariotas y levaduras tiene un grupo de sitio activo ditiol/disulfuro (par de cisteína). En la tiorredoxina reductasa de mamíferos, el centro de óxido-reducción difiere por tener un residuo de cisteína y uno de selenocisteína. Una vez formados, dADP, dGDP y dCDP se fosforilan a nivel de trifosfato por acción de las nucleósido difosfato cinasas. Como veremos en la siguiente sección, la dUDP se convierte en dTMP a través de dUMP.

En la sección 3.3 se observa la estructura de la selenocisteína, el 21o. aminoácido.

La ribonucleótido reductasa tiene un mecanismo complicado de regulación alostérica que suministra un conjunto balanceado de los desoxinucleótidos necesarios para la síntesis del ADN. Tanto la especificidad del sustrato como la velocidad catalítica de la ribonucleótido reductasa están regulados en las células eucarióticas por la unión reversible de metabolitos de nucleótido. Los moduladores alostéricos, ATP, dATP, dTTP y dGTP, actúan uniéndose a la ribonucleótido reductasa en alguno de dos sitios reguladores. Un sitio alostérico, llamado sitio de actividad, controla la actividad del sitio catalítico.

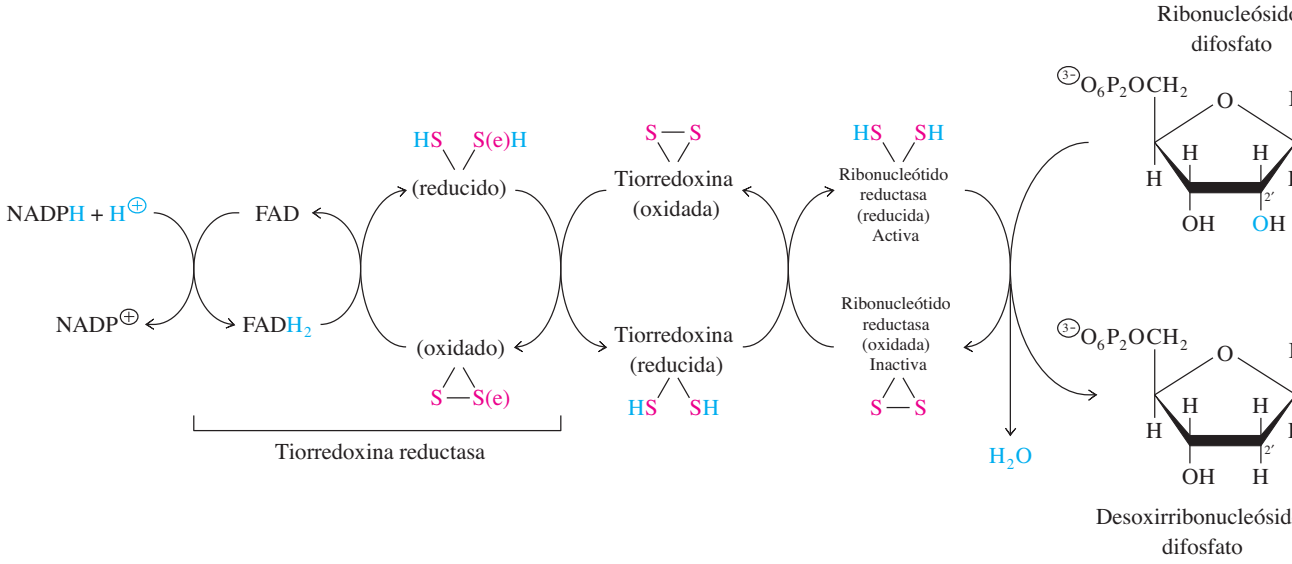


Figura 18.14 ▲
Reducción de los ribonucleósidos difosfato. Intervienen tres proteínas: la flavoproteína tiorredoxina reductasa dependiente de NADPH, la tiorredoxina y la ribonucleótido reductasa. B representa una base de purina o pirimidina. S(e) representa azufre o selenio.

TABLA 18.1 Regulación alostérica de ribonucleótido reductasa eucariótica

Ligando unido al sitio de actividad	Ligando unido al sitio de especificidad	Actividad catalítica del sitio
dATP		Enzima inactiva
ATP	ATP o dATP	Específica para CDP o UDP
ATP	dTTP	Específica para GDP
ATP	dGTP	Específica para ADP

Un segundo sitio alostérico, llamado sitio de especificidad, controla la especificidad del sustrato del sitio catalítico. El enlazamiento de ATP al sitio de actividad activa la reductasa; el enlazamiento de dATP al sitio de actividad inhibe toda actividad enzimática. Cuando se une ATP al sitio de actividad y el ATP o el dATP se unen al sitio de especificidad, la reductasa se vuelve específica de pirimidina y cataliza la reducción de CDP y UDP; la unión de dTTP con el sitio de especificidad activa la reducción de GDP, y la unión de dGTP activa la reducción de ADP. La regulación alostérica de la ribonucleótido reductasa, resumida en la tabla 18.1, controla la actividad enzimática y asegura una selección balanceada de los desoxirribonucleótidos para la síntesis del ADN.

18.6 La metilación de dUMP produce dTMP

El desoxitimidilato (dTMP) se forma a partir de la UMP en cuatro pasos. La UMP se fosforila a UDP, que se reduce a dUDP, y el dUDP se desfosforila a dUMP, que a continuación se metila.

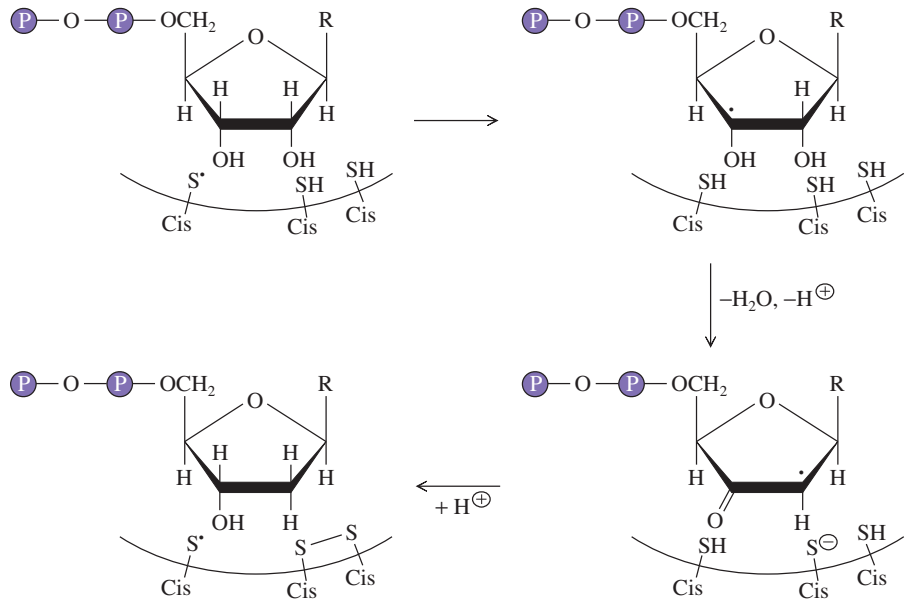
$$\text{UMP} \longrightarrow \text{UDP} \longrightarrow \text{dUDP} \longrightarrow \text{dUMP} \longrightarrow \text{dTMP} \qquad \textbf{(18.2)}$$

La conversión de dUDP a dUMP puede hacerse por dos rutas. La dUDP puede reaccionar con ADP en presencia de la nucleósido monofosfato cinasa para formar dUMP y ATP.

RECUADRO 18.3 Radicales libres en la reducción de ribonucleótidos

La reducción de ribonucleótidos, catalizada por ribonucleótido reductasa, donde se sustituye un —OH unido a carbono por un —H, es una reacción poco común. La reacción se efectúa por un mecanismo de radical libre. La primera pista de la naturaleza de radical libre de la reacción fue observar que se podía aislar la reductasa de *E. coli* con un residuo de tirosina en la forma de radical libre. Fue la primera proteína radical libre que se descubrió. El papel del radical de tirosina es convertir, durante la catálisis, el grupo tiol de un residuo de cisteína en el sitio activo a un radical tiílo. (Con la enzima de *Lactobacillus*, la cobalamina sirve para convertir el tiol de sitio activo en un radical).

El mecanismo propuesto se ve en la figura siguiente. El sitio activo de la reductasa tiene tres residuos de cisteína: uno forma el radical libre y los otros dos son un grupo de oxidación-reducción. El radical tiílo elimina un átomo de hidrógeno del C-3′ del ribonucleótido, por lo que se forma un sustrato radical. Este sustrato radical se deshidrata primero (perdiendo el —OH en C-2′) y después se reduce por el par de reducción de cisteína. Un átomo de hidrógeno regresa al C-3′ regenerando el radical tiílo.



$$\text{dUDP} + \text{ADP} \rightleftharpoons \text{dUMP} + \text{ATP} \qquad \textbf{(18.3)}$$

La dUDP también se puede fosforilar a dUTP a expensas de ATP por acción de la nucleósido difosfato cinasas. Entonces la dUTP se hidroliza rápidamente a dUMP + PP_i por acción de la desoxiuridina trifosfato difosfohidrolasa (dUTPasa).

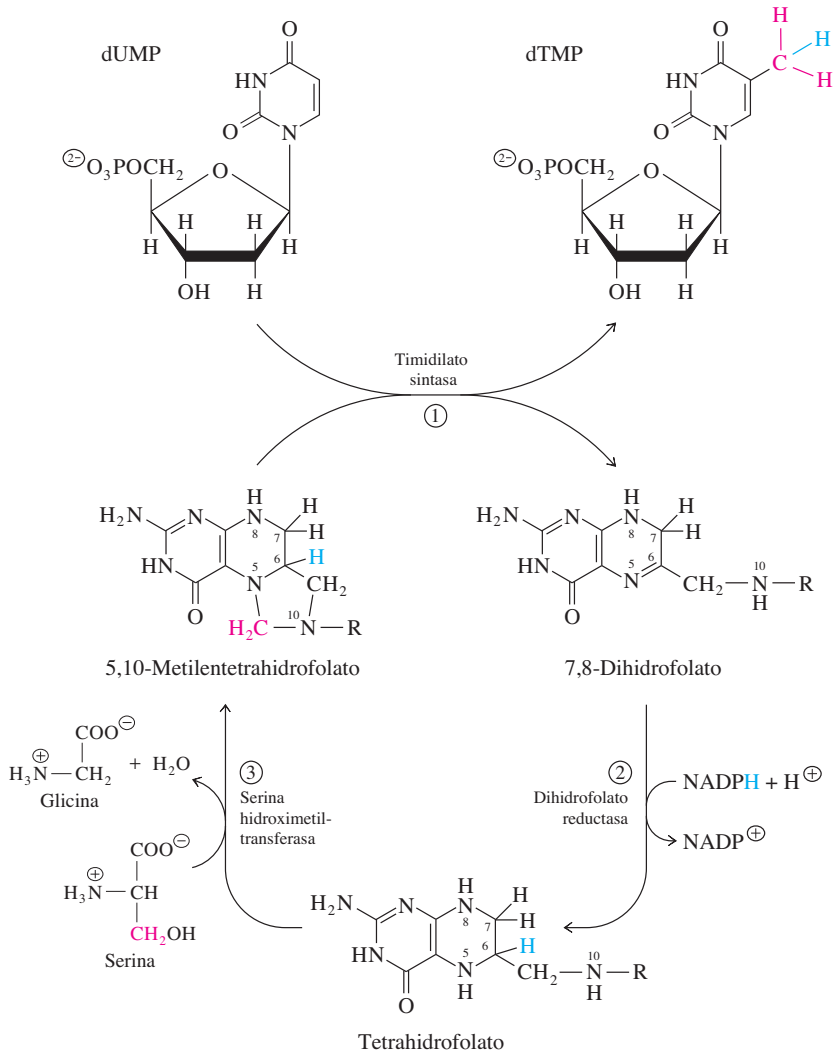
$$\text{dUDP} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{ADP}} \text{dUTP} \xrightarrow{H_2O} \text{dUMP} + PP_i \qquad \textbf{(18.4)}$$

La hidrólisis rápida de la dUTP evita que se incorpore en forma accidental al ADN en vez de dTTP.

El dCMP también puede ser una fuente de dUMP por hidrólisis catalizada por la dCMP desaminasa.

$$\text{dCMP} + H_2O \longrightarrow \text{dUMP} + NH_4^{\oplus} \qquad \textbf{(18.5)}$$

La conversión de dUMP en dTMP es catalizada por la enzima timidilato sintasa. (Como la timina está casi exclusivamente en ADN, se suelen usar los nombres triviales timidina y timidilato en vez de desoxitimidina y desoxitimidilato). En esta reacción, el 5,10-metilentetrahidrofolato es el donador del grupo con un carbono (figura 18.15). El grupo metilo unido a carbono (C — CH_3) en el dTMP está más reducido que el grupo



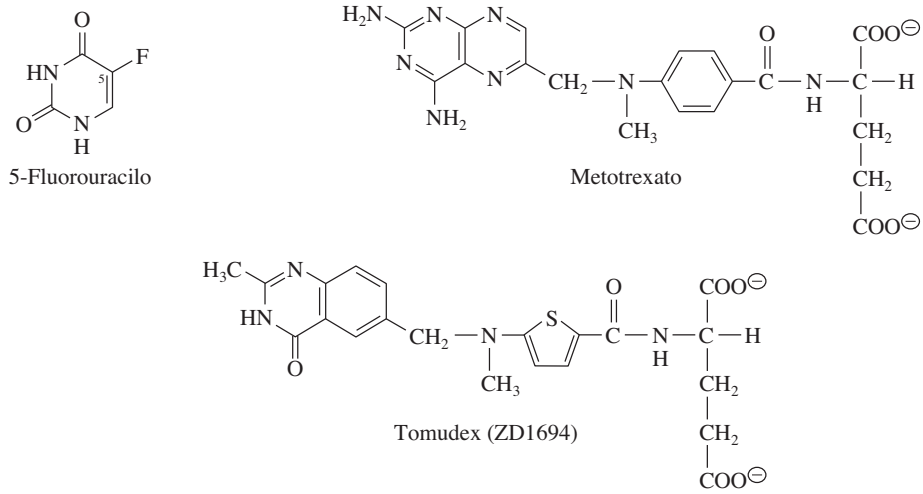
◀Figura 18.15
Ciclo de reacciones en la síntesis de timidilato (dTMP) a partir de dUMP. La timidilato sintasa cataliza la primera reacción de este ciclo, y produce dTMP. El otro producto de la reacción es el dihidrofolato, que debe reducir el NADPH en una reacción catalizada por la dihidrofolato reductasa para que se pueda adicionar un grupo metileno y regenerar el 5,10-metilentetrahidrofolato. El metilentetrahidrofolato se regenera en una reacción catalizada por la serina hidroximetiltransferasa.

RECUADRO 18.4 Los medicamentos contra el cáncer inhiben la síntesis de dTTP

Como el dTMP es precursor esencial del ADN, todo agente que haga bajar los niveles de dTMP afecta la división celular en forma notable. Ya que las células en división rápida dependen en especial de las actividades de la timidilato sintasa y la dihidrofolato reductasa, esas enzimas han sido objetivos principales de los medicamentos contra el cáncer. La inhibición de una o las dos enzimas bloquea la síntesis de dTMP y en consecuencia la síntesis del ADN.

Son eficaces el 5-fluorouracilo, el metotrexato y Tomudex en el combate contra algunos tipos de cáncer. El 5-fluorouracilo se convierte en su desoxirribonucleótido, 5-fluorodesoxiuridilato, que se une fuertemente a la timidilato sintasa para inhibir la enzima y detener el ciclo de tres reacciones que muestra la figura 18.15. El metotrexato, análogo del folato, es un potente inhibidor, relativamente específico de la dihidrofolato reductasa, que cataliza el paso 2 del ciclo que muestra la figura 18.15. La disminución resultante de concentraciones de tetrahidrofolato hace disminuir mucho la formación de dTMP, ya que la síntesis de dTMP depende de que haya concentraciones adecuadas de metilentetrahidrofolato. Tomudex es un nuevo inhibidor a base de folato de la timidilato sintasa humana, que ha sido aprobado en Europa para el tratamiento del cáncer.

◀ Estructura de cinta de la dihidrofolato reductasa humana, con el análogo del sustrato metotrexato (en rojo) y el cosustrato NADPH (en amarillo) unidos en el sitio activo. [PDB 1DLS]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).



▲ 5-Fluoroacilo, metotrexato y Tomudex son medicamentos para inhibir la producción de las células cancerosas.

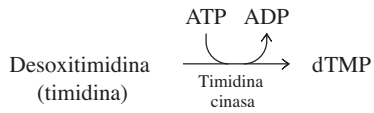
metileno, con puente de nitrógeno (N — CH_2 — N) en el 5,10-metilentetrahidrofolato, cuyo estado de oxidación equivale al de un grupo hidroximetilo unido al nitrógeno (N — CH_2OH) o al formaldehído. Entonces, no sólo el metilentetrahidrofolato es una coenzima que dona una unidad de carbono, sino también es el agente reductor para la reacción y suministra un ion hidruro al oxidarse en el proceso a 7,8-dihidrofolato. Es la única reacción conocida en la que la transferencia de una unidad de carbono de un derivado de tetrahidrofolato da como resultado su oxidación en el N-5 y el C-6, para producir dihidrofolato.

El dihidrofolato debe convertirse a tetrahidrofolato antes de que la coenzima pueda aceptar otra unidad de carbono para participar en más reacciones de transferencia. El doble enlace 5,6 del dihidrofolato se reduce con la NADPH en una reacción catalizada por la dihidrofolato reductasa. La serina hidroximetiltransferasa (ecuación 17.10) cataliza

entonces la transferencia del grupo CH_2OH de la serina al tetrahidrofolato, para regenerar el 5,10-metilentetrahidrofolato.

En la mayoría de los organismos, la timidilato sintasa y la dihidrofolato reductasa son polipéptidos distintos. Sin embargo, en los protozoarios las dos actividades enzimáticas están contenidas en la misma cadena de polipéptidos. El dihidrofolato producido se canaliza del sitio activo de la timidilato sintasa al sitio activo de la dihidrofolato reductasa. Por interacciones entre las cargas de una región con carga positiva en la superficie de la enzima bifuncional, y el dihidrofolato con carga negativa (recuérdese que contiene varios residuos de γ-glutamato, sección 7.9), el producto se dirige hacia el siguiente sitio activo.

También se puede sintetizar dTMP por vía de la recuperación de la timidina (desoxitimidina), catalizada por la timidina cinasa, dependiente de ATP.



(18.6)

Con frecuencia se utiliza timidina radiactiva como trazador muy específico para vigilar la síntesis intracelular del ADN, porque entra con facilidad a las células y su principal destino metabólico es la conversión a timidilato e incorporación al ADN.

18.7 Recuperación de purinas y pirimidinas

Durante el metabolismo celular normal, los ácidos nucleicos se degradan a mononucleótidos, nucleósidos y al final a bases heterocíclicas (figura 18.16). Las reacciones catabólicas son catalizadas por las ribonucleasas, desoxirribonucleasas y diversas nucleotidasas, fosfatasas no específicas y nucleosidasas o nucleósido fosforilasas. Algunas de las bases de purina y pirimidina que se forman de esta manera se siguen degradando (por ejemplo, las purinas se convierten en ácido úrico y otros productos de excreción), pero una fracción apreciable se recupera (se "salva") por lo regular mediante conversión directa en 5′-mononucleótidos. El PRPP (véase la figura 18.5) es el donador de la parte del 5-fosforribosilo para las reacciones de recuperación. Las rutas de recuperación y degradación son parte del metabolismo de combustibles en los animales. Las purinas y las pirimidinas formadas durante la digestión se degradarán con más probabilidad, en tanto que las formadas dentro de la célula se suelen recuperar. El reciclamiento de las bases intactas conserva la energía celular.

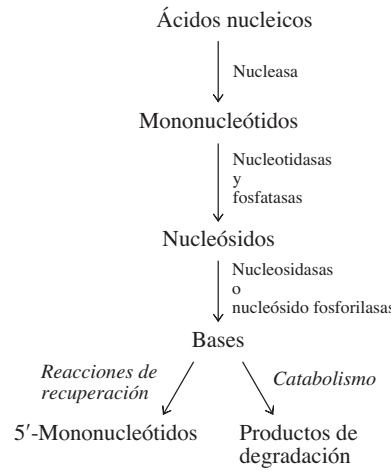
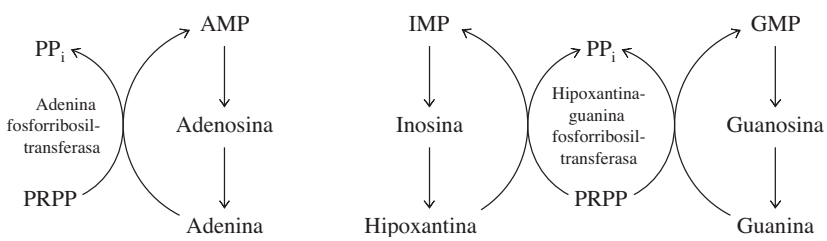


Figura 18.16 ▲
Descomposición de los ácidos nucleicos.

La degradación de los nucleótidos de purina hasta sus respectivas purinas, y su recuperación por reacción con el PRPP se describen en la figura 18.17. La adenina fosforribosiltransferasa cataliza la reacción de la adenina con el PRPP para formar AMP y PP_i. La hidrólisis del PP_i, catalizada por la pirofosfatasa, hace que la reacción sea metabólicamente irreversible. La hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa cataliza reacciones similares: la conversión de la hipoxantina en IMP y de guanina en GMP con formación de PP_i.

Las pirimidinas se recuperan por acción de la orotato fosforribosiltransferasa, que cataliza el paso 5 de la ruta de la biosíntesis (figura 18.10). Esta enzima también puede catalizar la conversión de pirimidinas distintas al orotato, formando los nucleótidos de pirimidina correspondientes.



◀Figura 18.17
Degradación y recuperación de las purinas.

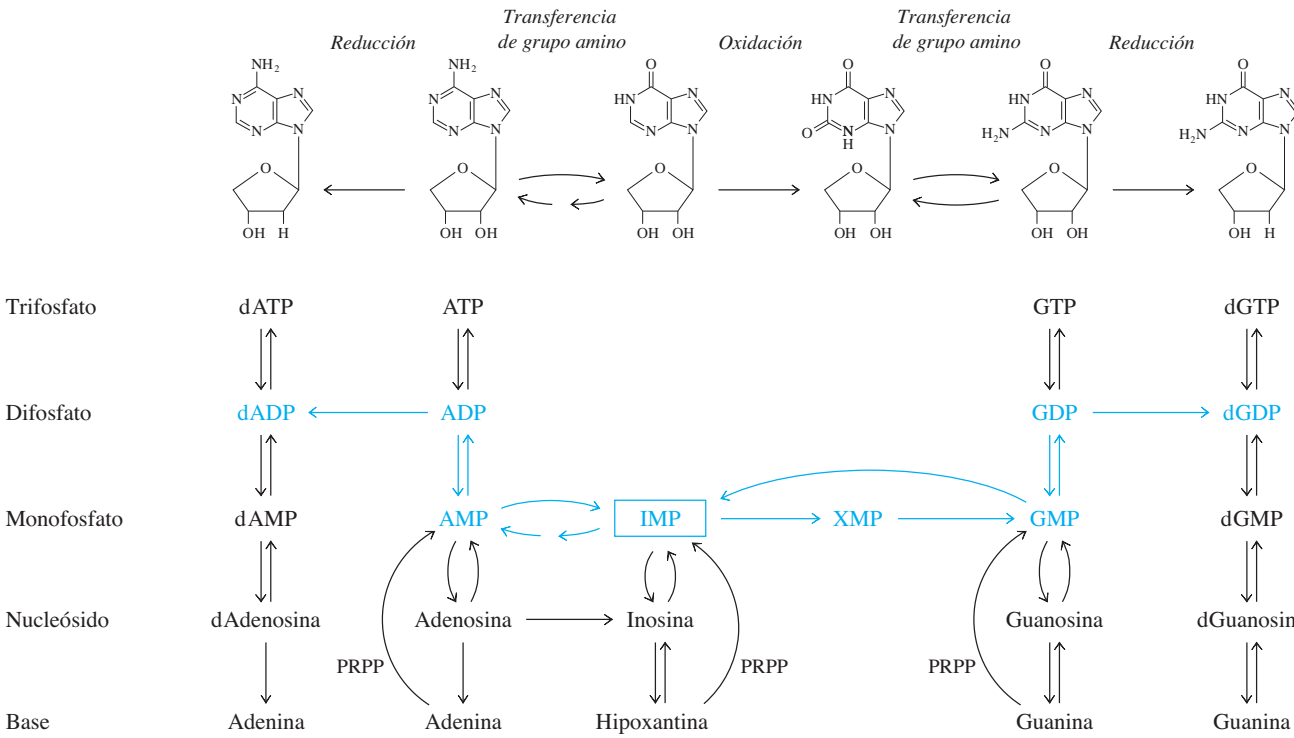


Figura 18.18 ▲
Interconversiones de los nucleótidos de purina y sus componentes. IMP, el primer nucleótido producido en la ruta de la biosíntesis, se convierte con facilidad en AMP y GMP, sus difosfatos y trifosfatos, y en las contrapartes desoxi de esos nucleótidos. Los grupos 5′-fosfato no se muestran en las estructuras abreviadas. [Adaptado de T. W. Traut (1988). Enzymes of nucleotide metabolism: the significance of subunit size and polymer size for biological function and regulatory properties. *Crit. Rev. Biochem.* 23:121-169].

Los nucleótidos y sus componentes se interconvierten mediante muchas reacciones, algunas de las cuales ya se han visto. Las acciones de las fosfatasas, nucleotidasas y nucleosidasas, o nucleósido fosforilasas, pueden liberar bases de los nucleótidos. Las reacciones catalizadas por las fosforribosiltransferasas o nucleósido fosforilasas pueden recuperar las bases y los nucleósidos convirtiéndolos al nivel de nucleótido. Las bases que no se recuperan se pueden catabolizar. Las interconversiones de los nucleótidos de purina y sus componentes se resumen en la figura 18.18, y las de los nucleótidos de pirimidina y sus constituyentes se resumen en la figura 18.19, en la página siguiente.

18.8 Catabolismo de purina

Aunque la mayor parte de las moléculas de purina y pirimidina se recuperan, algunas se catabolizan. Como se verá a continuación, las aves, algunos reptiles y los primates (incluyendo a los humanos) convierten los nucleótidos de purina en ácido úrico, que se excreta. En las aves y los reptiles, el catabolismo de los aminoácidos lleva también al ácido úrico; en los mamíferos, el nitrógeno sobrante del catabolismo de los aminoácidos se elimina en forma de urea. Las aves y los reptiles no pueden seguir catabolizando el ácido úrico, pero muchos organismos lo degradan formando otros productos.

Como se ve en la figura 18.18, el AMP se puede descomponer en hipoxantina, y el GMP se degrada a guanina. La eliminación hidrolítica del fosfato del AMP y el GMP producen adenosina y guanosina, respectivamente. La adenosina se puede desaminar a

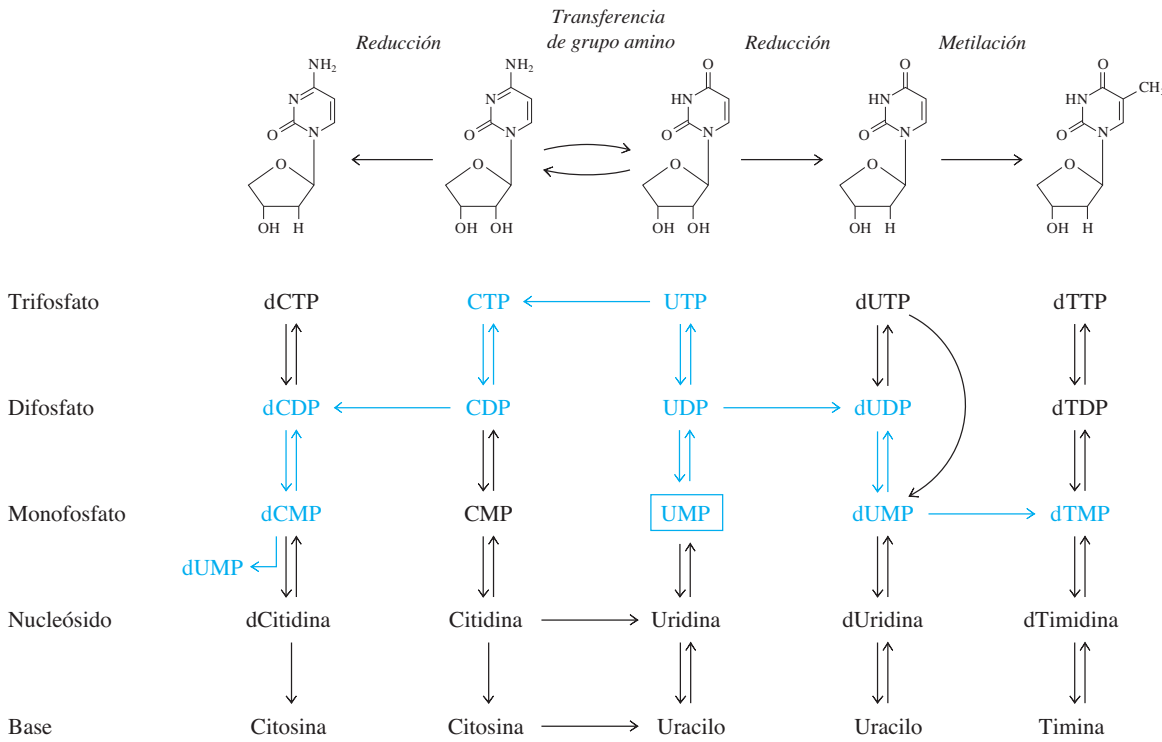


Figura 18.19 ▲
Interconversiones de nucleótidos de pirimidina y sus componentes. El UMP formado por la ruta de biosíntesis se puede convertir en fosfatos de citidina y timidina, así como en otros derivados de uridina. No se muestran los grupos 5′-fosfato en las estructuras abreviadas. [Adaptado de T. W. Traut (1988). Enzymes of nucleotide metabolism: the significance of subunit size and polymer size for biological function and regulatory properties. *Crit. Rev. Biochem.* 23:121-169].

inosina, por acción de la adenosina desaminasa. El AMP también se puede desaminar a IMP por acción de AMP desaminasa, y después el IMP se puede hidrolizar a inosina. La fosforólisis de la inosina produce hipoxantina y la de la guanosina produce guanina. Las dos reacciones (igual que la fosforólisis de varios desoxinucleósidos) son catalizadas por la purina-nucleósido fosforilasa, y producen α-D-ribosa 1-fosfato (o desoxirribosa 1-fosfato) y la base de purina libre.

$$\text{(Desoxi)Nucleósido} + P_i \rightleftharpoons \text{Base} + \text{(Desoxi)-}\alpha\text{-D-Ribosa 1-fosfato} \qquad \textbf{(18.7)}$$

La adenosina no es sustrato para la purina-nucleósido fosforilasa en los mamíferos.

La hipoxantina formada a partir de la inosina se oxida a xantina, y la xantina se oxida a ácido úrico (figura 18.20, página siguiente). La xantina oxidasa o la xantina deshidrogenasa pueden catalizar ambas reacciones. En las reacciones catalizadas por la xantina oxidasa, los electrones se transfieren al O_2 para formar peróxido de hidrógeno, H_2O_2. (El H_2O_2 se convierte en H_2O y O_2 por acción de la catalasa). La xantina oxidasa, enzima extracelular en los mamíferos, parece ser una forma alterada de la enzima intracelular xantina deshidrogenasa, que genera los mismos productos que la xantina oxidasa, pero transfiere electrones del $NAD^{\oplus}$ para formar NADH. Esas dos actividades enzimáticas existen mucho en la naturaleza, y presentan una amplia especificidad de sustratos. Sus sitios activos contienen sistemas complejos de transferencia de electrones, que incluyen un grupo de hierro-azufre, una coenzima pterina con molibdeno enlazado, y FAD.

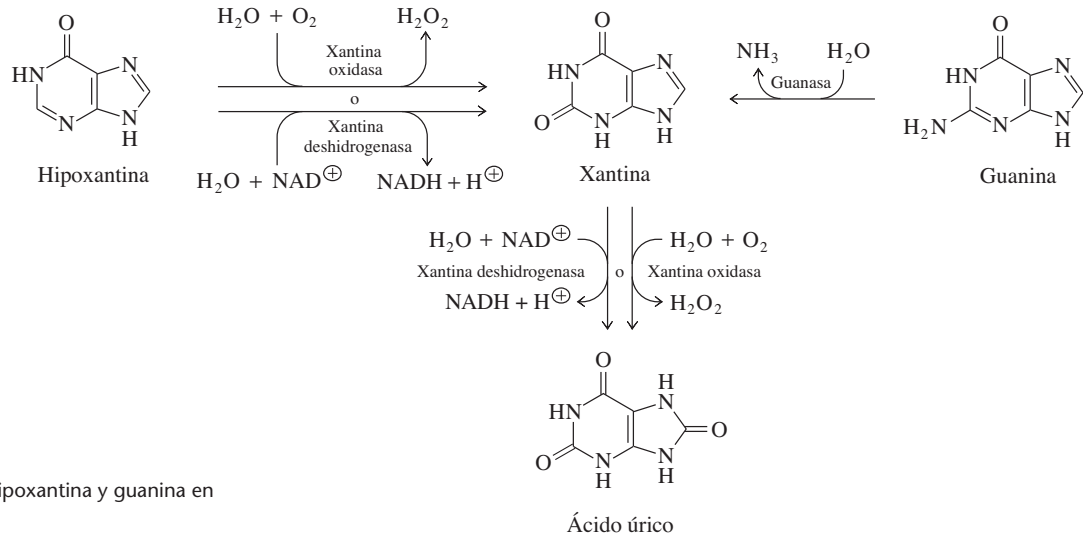
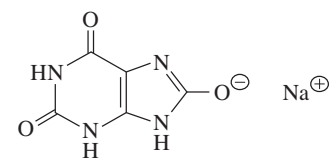


Figura 18.20 ▶
Descomposición de hipoxantina y guanina en ácido úrico.

RECUADRO 18.5 El síndrome de Lesch-Nyhan y la gota

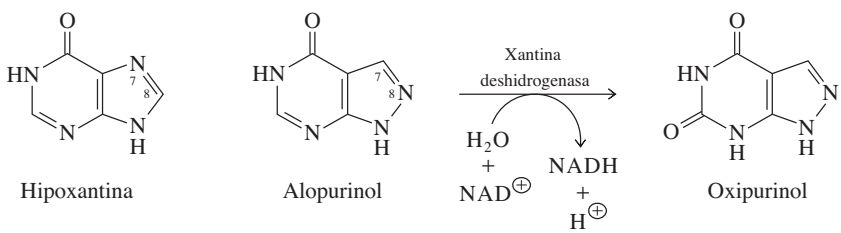
Como en otras rutas, los defectos en el metabolismo de la purina pueden tener efectos devastadores. En 1964, Michael Lesch y William Nyhan describieron una grave enfermedad metabólica caracterizada por retardo mental, perlesía refleja y una valiente tendencia hacia la automutilación. Las personas afectadas por esta enfermedad, llamada síndrome de Lesch-Nyhan, rara vez sobreviven a la niñez. Las características bioquímicas prominentes de la enfermedad son la excreción de hasta seis veces la cantidad normal de ácido úrico, y una tasa muy aumentada de biosíntesis de purina. La enfermedad es causada por una deficiencia hereditaria de la actividad de la enzima hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (sección 18.9). Esta enfermedad suele atacar a los varones porque la mutación es recesiva y el gen para esta enzima está en el cromosoma X. Los pacientes de síndrome de Lesch-Nyhan suelen tener menos de 1% de la actividad normal de la enzima, y la mayoría tienen ausencia completa de la actividad. Al carecer de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa, la hipoxantina y la guanina se degradan a ácido úrico, en vez de convertirse en IMP y GMP, respectivamente. El PRPP que se usa normalmente para la recuperación de hipoxantina y guanina contribuye a la síntesis de cantidades excesivas de IMP, y el IMP sobrante se degrada a ácido úrico. No se sabe cómo causa este solo defecto de la enzima los distintos síntomas conductuales. Los efectos catastróficos de la deficiencia indican que en algunas células la ruta de recuperación de purina en los humanos no sólo es un anexo a las rutas centrales de metabolismo de nucleótidos de purina, para ahorrar energía.

La gota es una enfermedad causada por sobreproducción o excreción inadecuada de ácido úrico. El urato de sodio es relativamente insoluble, y cuando es elevada su concentración en la sangre, puede cristalizar (a veces junto con ácido úrico) en los tejidos blandos, en especial en los riñones, dedos de los pies y articulaciones. La gota tiene varias causas que incluyen una deficiencia de actividad de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa, que da como resultado menos recuperación de purinas y más producción catabólica de ácido úrico. La diferencia entre la gota y el síndrome de Lesch-Nyhan se debe a que los pacientes con gota conservan hasta 10% de la actividad enzimática. La gota también se puede deber a la regulación defectuosa de la biosíntesis de purinas.



Urato de sodio

La gota puede combatirse administrando a los pacientes alopurinol, un isómero de posición C-7, N-8 de la hipoxantina. El alopurinol se convierte en oxipurinol en las células, potente inhibidor de la xantina deshidrogenasa. La administración de alopurinol evita la formación de concentraciones anormalmente altas de ácido úrico. La hipoxantina y la xantina son más solubles que el urato de sodio y el ácido úrico, y cuando no se vuelven a usar en reacciones de recuperación, se excretan.



◀ Alopurinol y oxipurinol. La xantina deshidrogenasa cataliza la oxidación del alopurinol, un isómero de la hipoxantina. El producto es oxipurinol y se enlaza fuertemente a la xantina deshidrogenasa, inhibiéndola.

En la mayor parte de las células, la guanina se desamina a xantina en una reacción catalizada por la guanasa (figura 18.20). Los animales que carecen de guanasa excretan guanina. Por ejemplo, los cerdos excretan guanina, pero metabolizan derivados de la adenina hasta llegar a la lantoína, el principal producto final del catabolismo de purinas en la mayor parte de los mamíferos.

En la mayoría de los organismos, el ácido úrico se puede seguir oxidando. La urato oxidasa cataliza la conversión de ácido úrico, dependiente de O_2, a alantoína, H_2O_2 y CO_2 (figura 18.21) La alantoína es el producto final principal de la degradación de la purina en la mayoría de los mamíferos (pero no en los humanos, para quienes el producto final es el ácido úrico). También la excretan las tortugas, algunos insectos y los gasterópodos.

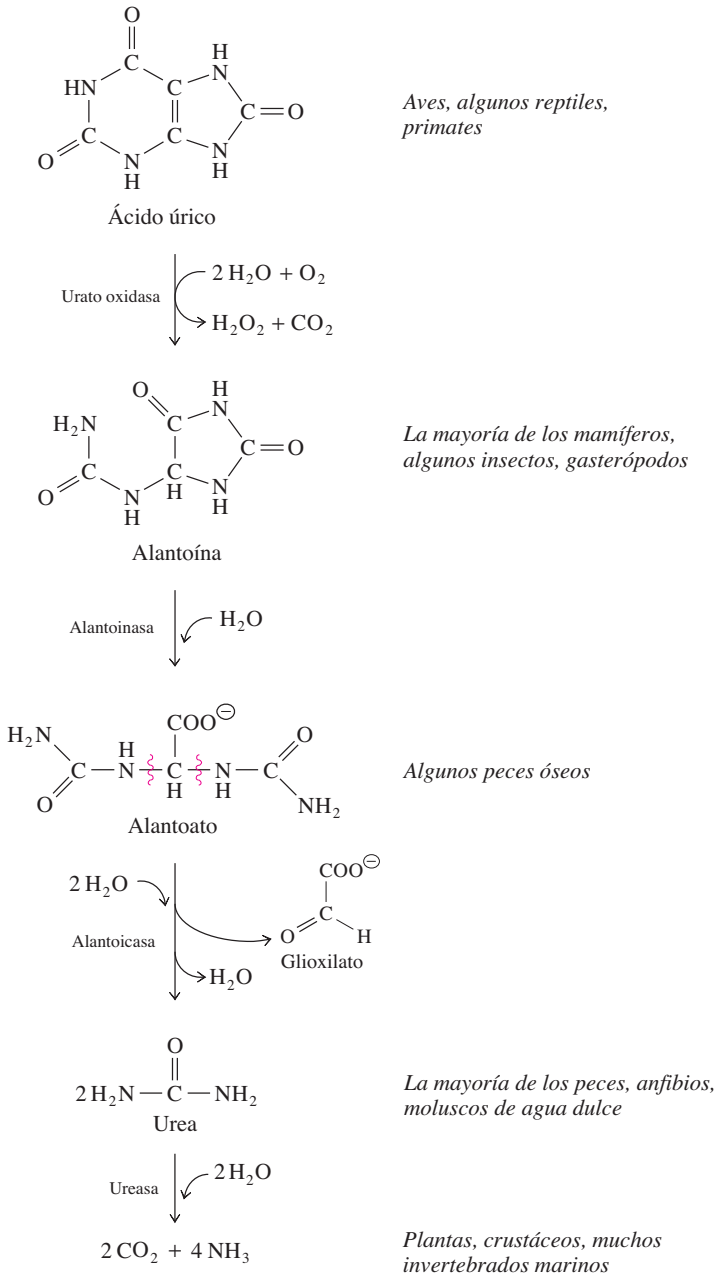


Figura 18.21 ▲
Catabolismo de ácido úrico por oxidación e hidrólisis. A la derecha de cada compuesto se indican los organismos para los cuales es producto de excreción.

En otros organismos, la enzima alantoinasa cataliza la abertura hidrolítica del anillo de imidazol en la alantoína, para producir alantoato, la base conjugada del ácido alantoico. Algunos peces óseos (teleósteos) poseen actividad de alantoinasa y excretan alantoato como producto final de la degradación de la purina.

La mayoría de los peces, anfibios y moluscos de agua dulce pueden seguir degradando al alantoato. Estas especies contienen alantoicasa, que cataliza la hidrólisis del alantoato para formar una molécula de glioxilato y dos moléculas de urea. Así, la urea es el producto final nitrogenado del catabolismo de purinas en estos organismos.

Por último, varios organismos, que incluyen plantas, crustáceos y muchos invertebrados marinos, pueden hidrolizar urea en una reacción catalizada por la ureasa. Los productos de esta reacción son dióxido de carbono y amoniaco. La ureasa sólo existe en las células de organismos en los que la hidrólisis de la urea no causa toxicidad por amoniaco. Por ejemplo, en las plantas, el amoniaco generado a partir de la urea se asimila rápidamente por acción de la glutamina sintetasa. En las criaturas marinas se produce amoniaco en los órganos superficiales, como agallas, y se lava antes de que pueda acumularse y alcanzar niveles tóxicos. Es probable que las enzimas que catalizan el catabolismo del ácido úrico se hayan perdido en la evolución por organismos que excretan ácido úrico. La mayoría de los organismos terrestres se envenenaría con el amoniaco, producto final nitrogenado.

18.9 Ciclo de nucleótidos de purina en los músculos

El ejercicio muscular produce amoniaco en proporción con el trabajo efectuado. El amoniaco se genera en la actividad de una ruta cíclica en los vertebrados que soporta algo de las necesidades de energía para el trabajo muscular. La secuencia de reacciones, llamada ciclo de nucleótidos de purina, se observa en la figura 18.22. El AMP se forma al contraerse el músculo, por la conversión de 2 ADP a AMP + ATP, catalizada por la adenilato cinasa (sección 10.6). Durante una contracción muscular intensa, la mioadenilato desaminasa cataliza la desaminación de AMP a IMP. Es una desaminasa muscular específica diferente de la adenosina desaminasa del catabolismo normal de las purinas. El consumo de AMP altera la posición de equilibro de la reacción de la adenilato cinasa, produciendo más ATP para la contracción muscular. La IMP se recicla a AMP por las reacciones de la figura 18.7, la condensación de IMP con aspartato y la eliminación de fumarato. La reacción neta para una vuelta al ciclo es

$$\text{Aspartato} + \text{GTP} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{Fumarato} + \text{GDP} + \text{P}_i + \text{NH}_3 \qquad \textbf{(18.8)}$$

Cuando está activo, el ciclo de nucleótidos de purina suministra fumarato al ciclo del ácido cítrico, lo cual aumenta la capacidad de la célula para oxidar a la acetil-CoA. El amino nitrógeno necesario para la operación continua del ciclo proviene de los aminoácidos que sufren transaminación con α-cetoglutarato para formar el glutamato, que se transamina con el oxaloacetato para formar el aspartato que entra al ciclo de los nucleótidos de purina.

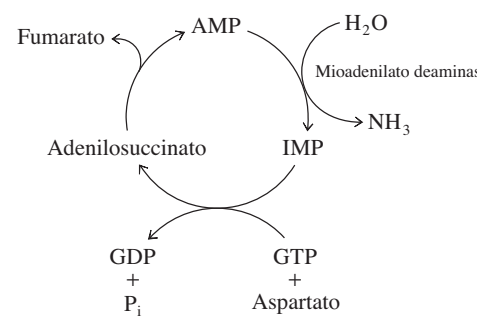
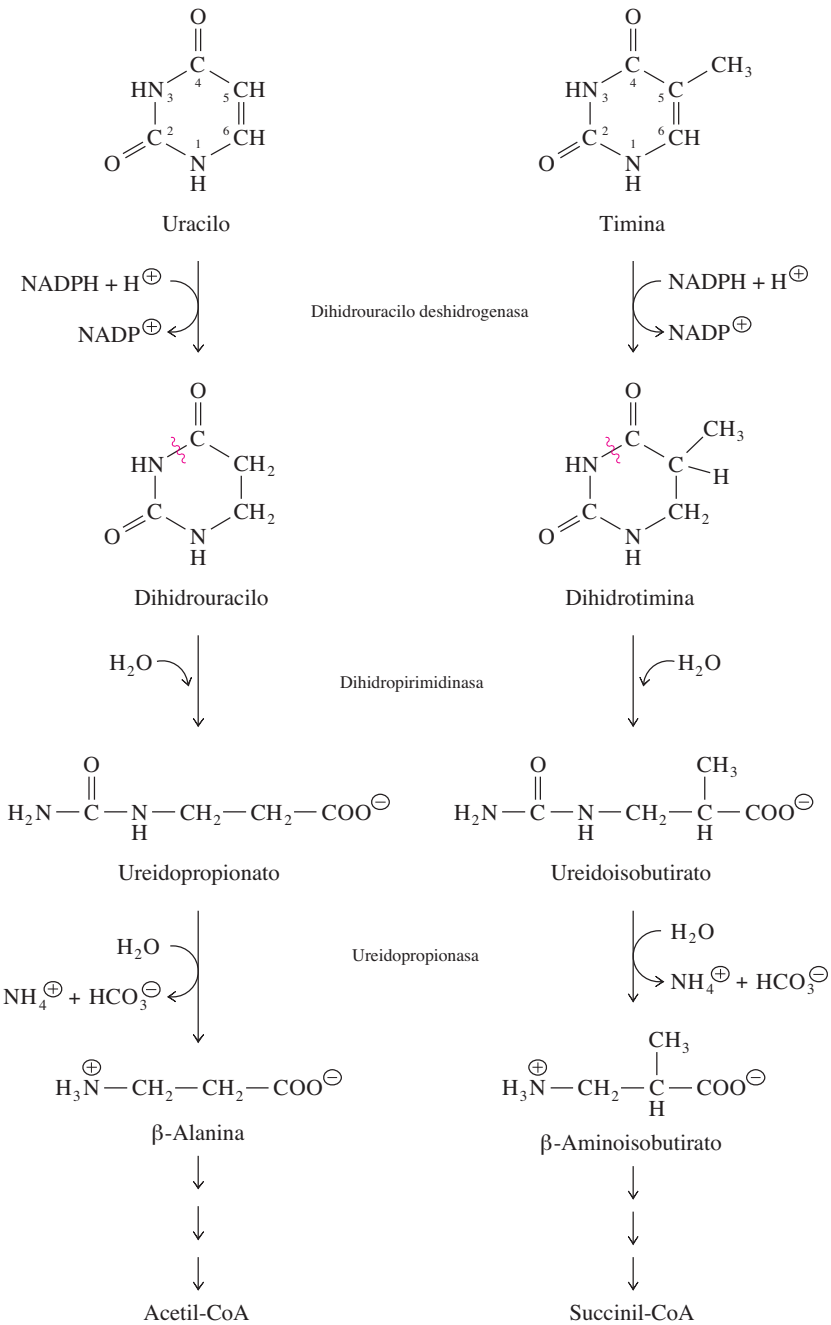


Figura 18.22 ▶
Ciclo de los nucleótidos de purina.

18.10 Catabolismo de la pirimidina

Como se resume en la figura 18.23, el catabolismo de los nucleótidos de pirimidina comienza con la hidrólisis para formar los nucleósidos correspondientes y P_i, catalizada por la 5′-nucleosidasa. En el caso de la CMP, la hidrólisis inicial a la citidina puede seguir una desaminación a uridina en una reacción catalizada por la citidina desaminasa. Los enlaces glucosídicos de la uridina y la timidina se rompen entonces por fosforólisis, en reacciones catalizadas por la uridina fosforilasa y la timidina fosforilasa, respectivamente. Los productos de esas reacciones de fosforólisis son la α-D-ribosa 1-fosfato o desoxirribosa 1-fosfato, timina y uracilo.



◀Figura 18.23
Catabolismo de uracilo y timina.

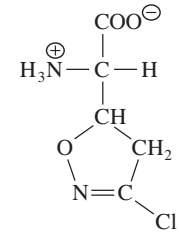
El catabolismo de las pirimidinas termina con compuestos intermedios en el metabolismo central, por lo que no se forman productos característicos de excreción. La descomposición del uracilo y la timina consiste en varios pasos (figura 18.23). Primero, el anillo de pirimidina se reduce a 5,6-dihidropirimidina en una reacción catalizada por la dihidrouracilo deshidrogenasa. A continuación se abre el anillo reducido por escisión hidrolítica del enlace en el N-3 — C-4, en una reacción catalizada por la dihidropirimidinasa. El carbamoíl-β-aminoácido resultante (ureidopropionato o ureidoisobutirato) se sigue hidrolizando a $NH_4^{\oplus}$, $HCO_3^{\ominus}$ y un β-aminoácido. La β-alanina (del uracilo) y el β-aminoisobutirato (de la timina) se pueden convertir entonces en la acetil-CoA y en el succinil-CoA, respectivamente, que pueden entrar al ciclo del ácido cítrico y convertirse en otros compuestos. En las bacterias también puede usarse la β-alanina en la síntesis del pantotenato, constituyente de la coenzima A.

Resumen

1. La síntesis de nucleótidos de purina es una ruta de 10 pasos que conduce a IMP (inosinato). La purina se ensambla en una base de ribosa 5-fosfato donada por el 5-fosforribosil 1-pirofosfato (PRPP).
2. El IMP se puede convertir en AMP o GMP.
3. En la síntesis del nucleótido de pirimidina UMP en seis pasos, el PRPP entra a la ruta después de terminarse la estructura del anillo.
4. Se forma CTP por aminación de UTP.
5. Los desoxirribonucleótidos se sintetizan por reducción de los ribonucleótidos en el C-2′, en una reacción catalizada por la ribonucleótido reductasa.
6. El timidilato (dTMP) se forma a partir del desoxiuridilato (dUMP) en una reacción de metilación, donde el 5,10-metilenotetrahidrofolato dona un grupo de un carbono y también un ion hidruro. El 7,8-dihidrofolato es el otro producto de esta metilación y se recicla por reducción dependiente del NADPH para formar tetrahidrofolato, la coenzima activa.
7. El PRPP reacciona con las pirimidinas y las purinas en reacciones de recuperación para formar los nucleósido monofosfatos. Los nucleótidos y sus componentes se interconvierten mediante diversas enzimas.
8. En las aves y en algunos reptiles, el nitrógeno de los aminoácidos y los nucleótidos de purina se excretan como ácido úrico. Los primates degradan a las purinas hasta ácido úrico. La mayoría de los demás organismos siguen catalizando al ácido úrico hasta alantoína, alantoato, urea o amoniaco.
9. El ciclo de los nucleótidos de purina genera amoniaco y fumarato en los músculos.
10. Las pirimidinas se catabolizan a amoniaco, bicarbonato y acetil-CoA (de citosina o uracilo) o a succinil-CoA (de timina).

Problemas

1. Indique dónde aparece la marca en el producto de cada uno de los siguientes pares precursor-producto
   a) ^{15}N-aspartato → AMP
   b) 2-[^{14}C]-glicina → AMP
   c) δ-[^{15}N]-glutamina → GMP
   d) 2-[^{14}C]-aspartato → UMP
   e) $H^{14}CO_3^{\ominus}$ → UMP
2. ¿Cuántos equivalentes de ATP se necesitan para sintetizar una molécula de IMP a partir de la ribosa 5-fosfato? Suponga que están presentes todos los precursores necesarios en la ruta.
3. La incorporación de unidades con un carbono en las rutas de biosíntesis de las purinas y las pirimidinas requiere derivados de tetrahidrofolato (THF) como donantes. Escriba las reacciones que requieren derivados de THF, indique el donador de THF y cuál carbono de purina o pirimidina está marcado.
4. La acivicina, análogo de la glutamina, es un agente anticancerígeno potencial, porque detiene el crecimiento rápido de las células al inhibir la biosíntesis de los nucleótidos.



Acivicina

a) Indique cómo se parecen estructuralmente la acivicina y la glutamina.
b) ¿Qué producto intermedio se acumula en la ruta de la biosíntesis de purina, cuando está presente la acivicina?
c) ¿Qué enzima se inhibe en la ruta de la biosíntesis de la pirimidina cuando está presente la acivicina?

5. Una bacteria hipotética sintetiza UMP por una ruta análoga a la de *E. coli*, excepto que se usa la β-alanina en vez del aspartato.

$$H_3{}^{\oplus}N-CH_2-CH_2-COO^{\ominus}$$

β-Alanine

a) ¿Por qué podría ser más corta esta ruta que la de *E. coli*?
b) Cuando se usa la β-alanina marcada uniformemente con ^{14}C ¿dónde aparecería la marca en la UMP?

6. *a*) La enzima dCMP desaminasa puede formar una ruta principal de la citidina a los nucleótidos de uridina. ¿Cuál es el producto de la acción de la dCMP desaminasa sobre la dCMP?
b) Esta enzima alostérica está sujeta a inhibición por dTTP y a activación por dCTP. Explique por qué eso es razonable, en términos de las necesidades celulares generales de nucleósido trifosfatos.

7. En los eucariotas ¿cuántos equivalentes de ATP se necesitan para sintetizar una molécula de UMP a partir del $HCO3^{\ominus}$, aspartato, glutamina y ribosa 5-fosfato? (No tenga en cuenta todo ATP que pudiera producirse oxidando la QH_2 generada en la ruta).

8. El síndrome de inmunodeficiencia combinada grave (SCIDS)) se caracteriza por la carencia de una respuesta inmunitaria contra enfermedades infecciosas. Una forma de SCIDS se debe a una deficiencia de la adenosina desaminasa (ADA), enzima que cataliza la desaminación de la adenosina y la desoxiadenosina para formar la inosina y la desoxiinosina, respectivamente. La deficiencia enzimática aumenta las concentraciones de dATP, pero disminuye las de otros desoxinucleótidos y entonces inhibe la replicación del ADN y la división celular en ciertas células en rápida división. Explique cómo una deficiencia de la adenosina desaminasa afecta los niveles de los desoxinucleótidos. (La primera terapia genética efectiva en los humanos se efectuó transformando las células T de un paciente con un gen ADA normal).

9. Las personas con deficiencia de la mioadenilato desaminasa (MADA) heredada no padecen SCIDS. En su lugar, el síntoma principal es que se cansan con facilidad durante el ejercicio. Explique cómo la deficiencia enzimática afecta el metabolismo energético en los músculos. (La deficiencia MADA es muy común en los caucásicos. Más de 10% de la población porta cuando menos un alelo defectuoso).

10. Una de las causas de la gota es una deficiencia de la actividad de la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (recuadro 18.5). Otra causa se debe a un *aumento* de la actividad de la PRPP sintetasa. Si PRPP es un efector posible de la glutamina-PRPP aminotransferasa en los humanos ¿cómo afecta eso a la síntesis de la purina?

11. Identifique los nucleótidos implicados en las rutas siguientes.
a) el nucleótido trifosfato necesario como sustrato en la síntesis de NAD
b) el nucleótido trifosfato necesario en la síntesis de FMN
c) el nucleótido trifosfato que sirve como sustrato en la síntesis de la coenzima A
d) el sustrato para las proteínas G
e) el nucleótido que se usa en la síntesis de glucógeno a partir de la glucosa 6-fosfato
f) el cofactor necesario en la reacción catalizada por la succinil-CoA sintetasa de mamíferos
g) el cosustrato necesario para la síntesis de la fosfatidilserina a partir del fosfatidato
h) el nucleótido necesario para la activación de la galactosa en la biosíntesis de los cerebrósidos
i) el nucleótido sustrato que se usa en la biosíntesis de la histidina
j) el precursor común de AMP y GMP
k) el precursor de la hipoxantina

12. El catabolismo de las grasas y de los carbohidratos proporciona considerable energía metabólica en forma de ATP. La degradación de las purinas y las pirimidinas ¿proporciona una fuente apreciable de energía en las células eucarióticas?

13. La PRPP sintetasa usa la α-d-ribosa 5-fosfato como sustrato. ¿Cómo se forma el isómero α dentro de la célula?

14. Los nombres sistemáticos de las bases comunes aparecen en las secciones 18.1 y 18.2. ¿Cuáles son los nombres sistemáticos de xantina, hipoxantina y orotato?

15. La acción consecutiva de la adensilsuccinato sintetasa y de la adenilsuccinato liasa da como resultado la transferencia de un grupo amino del aspartato, y la liberación de fumarato. Identifique otros dos pares de enzimas que alcancen el mismo objetivo.

Lecturas seleccionadas

Metabolismo de la purina

Honzatko, R. B., Stayton, M. M. y Fromm, H. J. (1999). Adenosylsuccinate synthetase: recent developments. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 73:57-102. Describe la biosíntesis de los nucleótidos de purina y el ciclo de los nucleótidos de purina.

Zhang, R.-G., Evans, G., Rotella, F. J., Westbrook, E. M., Beno, D., Huberman, E., Joachimiak, A. y Collart, F. R. (1999). Characteristics and crystal structure of bacterial inosine-5′-monophosphate dehydrogenase. *Biochemistry* 38:4691-4700.

Metabolismo de la pirimidina

Blakley, R. L. (1995). Eukaryotic dihydrofolate reductase. *Adv. Enxymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 70:23-102. Descripción de esta enzima, necesaria para la biosíntesis de timidilato, objetivo de la quimioterapia del cáncer.

Carreras, C. W. y Santi, D. V. (1995). The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase. *Annu. Rev. Biochem*. 64:721-762. Se reseñan los detalles moleculares de la reacción catalizada por la timidilato sintasa.

Chan, R. S., Sakash, J. B., Macol, C. P., West, J. M., Tsuruta, H. y Kantrowitz, E. R. (2002). The role of intersubunit interactions for the stabilization of the T state of *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase. *J. Biol. Chem.* 277: 49755-49760.

Lipscomb, W. N., (1994). Aspartate transcarbamoylase from *Escherichia coli:* activity and regulation. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 68:67-151. Descripción de la regulación de la ATCasa, con base en estudios estructurales.

Raushel, F. M., Thoden, J. B. y Holden, H. M. (1999). The amidotransferase family of enzymes: molecular machines for the production and delivery of ammonia. *Biochemistry* 38:7891-7899.

Stroud, R. M. (1994). An electrostatic highway. *Struct. Bil.* 1:131-134. Describe la canalización de dihidrofolato entre los sitios activos de la timidilato sintasa y la dihidrofolato reductasa.

Reducción de ribonucleótidos

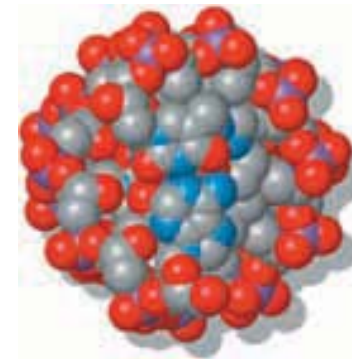
Gorlatov, S. N. y Stadtman, T. C. (1998). Human thioredoxin reductase from HeLa cells: selective alkylation of selenocysteine in the protein inhibits enzyme activity and reduction with NADPH influences affinity to heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:8520-8525.

Jordan, A. y Reichard, P. (1998). Ribonucleotide reductases. *Annu. Rev. Biochem.* 67:71-98. Describe las tres clases de las ribonucleótido reductasas, enfatizando las similitudes de sus mecanismos.

Stubbe, J. (1998). Ribonucleotide reductases in the twenty-first century. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:2723-2724. Comentario acerca de la investigación actual sobre las ribonucleótido reductasas.

19

Capítulo diecinueve



Ácidos nucleicos

El descubrimiento, en 1869, de la sustancia que resultó ser ácido desoxirribonucleico (ADN) fue de Friedrich Miescher, joven médico suizo que trabajaba en el laboratorio de Felix Hoppe-Seyler, químico fisiólogo alemán. Miescher trató glóbulos blancos (contenidos en la pus de vendas quirúrgicas desechadas) con ácido clorhídrico para obtener núcleos para estudio. Cuando después se trataron los núcleos con ácido, se formó un precipitado que contenía carbono, hidrógeno, oxígeno y un alto porcentaje de fósforo. Miescher llamó "nucleína" al precipitado, porque provenía de núcleos. Después, cuando se vio que era fuertemente ácido, su nombre cambió a ácido nucleico. Aunque no lo supo, Miescher había descubierto el ADN. Poco después, Hoppe-Seyler aisló una sustancia parecida de las células de levadura. Hoy se sabe que esa sustancia es ácido ribonucleico (ARN). Tanto ADN como ARN son polímeros de nucleótidos, o polinucleótidos.

En 1944, Oswald Avery, Colin MacLeod y Maclyn McCarty demostraron que el ADN es la molécula que contiene la información genética. En esos días se conocía muy poco acerca de la estructura de esta importante molécula. Durante los pocos años siguientes se determinaron las estructuras de los nucleótidos, y en 1953, James D. Watson y Francis H. C. Crick propusieron su modelo de la estructura de ADN de doble hebra.

El estudio de la bioquímica de ácidos nucleicos ha progresado en forma considerable durante las décadas pasadas. Hoy no sólo es posible determinar la secuencia de residuos de nucleótido en ADN, sino también sintetizar polinucleótidos específicos. Con el advenimiento de la tecnología de ADN recombinante, ya es rutinario clonar y manipular moléculas de ADN en el laboratorio (capítulo 23). Eso ha conducido a avances espectaculares en nuestra comprensión de la biología molecular y de las formas en que se expresa la información contenida en el ADN en las células vivas.

Ahora se sabe que un organismo vivo contiene un conjunto de instrucciones para cada paso necesario para formar una réplica de sí mismo. Esa información reside en el material genético o **genoma** del organismo. Los genomas de todas las células están formados por ADN. Algunos genomas virales están formados por ARN. Un genoma puede consistir en una sola molécula de ADN, como en muchas especies de bacterias.

Arriba: Modelo de relleno espacial del ADN, visto desde el eje de la hélice.

▲ James D. Watson (1928-) (izquierda) y Francis H. C. Crick (1916-2004) (derecha) describiendo la estructura del ADN en 1953.

En los eucariotas, el genoma es un conjunto completo de moléculas de ADN que se encuentran en el núcleo (es decir, el conjunto haploide de cromosomas en los organismos diploides). Por convención, el genoma de una especie no incluye ADN mitocondrial y de cloroplastos. Con raras excepciones, no hay dos individuos en una especie que tengan exactamente la misma secuencia del genoma. Si vivieran hoy, Miescher y Hoppe-Seyler quedarían asombrados al saber que se puede consignar a criminales mediante dactiloscopia de su ADN, y que se han secuenciado los genomas completos de docenas de especies, incluyendo los humanos.

En general, la información que especifica la estructura primaria de una proteína está codificada en la secuencia de nucleótidos en el ADN. Esta información se copia enzimáticamente durante la síntesis de ARN, en el proceso llamado transcripción. Algo de la información contenida en las moléculas transcritas de ARN se traduce o traslada durante la síntesis de cadenas de polipéptidos, que se doblan y se ensamblan entonces para formar moléculas de proteína. Así, se puede generalizar que la información biológica guardada en el ADN de una célula pasa del ADN al ARN y a la proteína.

Los ácidos nucleicos representan la cuarta gran clase de macromoléculas. Éstas, igual que las proteínas y los polisacáridos, contienen múltiples unidades monoméricas similares que se unen en forma covalente para producir polímeros grandes. En este capítulo se describirá la estructura de los ácidos nucleicos y la forma en que están empacados en las células. También se describirán algunas de las enzimas que usan ADN y ARN como sustratos. Hay muchas otras proteínas y enzimas que interactúan con ADN y ARN para asegurar que la información genética se interprete en forma correcta. En los capítulos 20, 21 y 22 se describirá la bioquímica y la regulación de este flujo de información.

19.1 Los nucleótidos son los bloques de construcción de los ácidos nucleicos

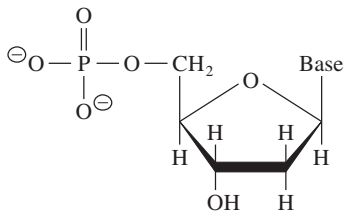


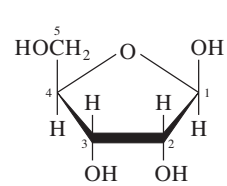
Figura 19.1 ▲
Estructura química de un nucleótido. Los nucleótidos contienen un azúcar con cinco carbonos, una base nitrogenada y al menos un grupo fosfato. El azúcar puede ser desoxirribosa (la que aquí se ve) o ribosa.

Los ácidos nucleicos son polinucleótidos, o polímeros de nucleótidos. Como se vio en el capítulo anterior, los nucleótidos tienen tres componentes: un azúcar con cinco carbonos, uno o más grupos fosfato y un compuesto nitrogenado débilmente básico llamado base (figura 19.1). Las bases que se encuentran en los nucleótidos son pirimidinas y purinas sustituidas. La pentosa suele ser ribosa (D-ribofuranosa) o 2-desoxirribosa (2-desoxi-D-ribofuranosa). Los *N*-glicósidos pirimidina o purina de estos azúcares se llaman nucleósidos. Los nucleótidos son los ésteres de fosfato de los nucleósidos; los nucleótidos comunes contienen uno a tres grupos fosforilo. Los nucleótidos que contienen ribosa se llaman ribonucleótidos, y los que contienen desoxirribosa se llaman desoxirribonucleótidos (sección 18.5).

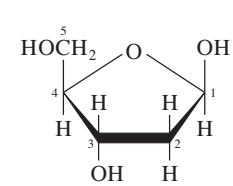
A. Ribosa y desoxirribosa

Los azúcares componentes de los nucleótidos que se encuentran en los ácidos nucleicos se muestran en la figura 19.2. Los dos azúcares aparecen como proyecciones de Haworth de la configuración β de las formas de anillo de furanosa (sección 8.2). Es la configuración estable que existe en los nucleótidos y polinucleótidos. Cada uno de esos anillos de furanosa puede adoptar conformaciones diferentes, como las formas de sobre descritas en el capítulo 8. La conformación 2′-endo de la desoxirribosa predomina en el ADN de doble hebra (figura 8.10).

Figura 19.2 ▶
Estructuras químicas de los dos azúcares contenidos en los nucleótidos. **a)** Ribosa (β-D-ribofuranosa). **b)** Desoxirribosa (2-desoxi-β-D-ribofuranosa).

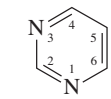


Ribosa
(β-D-Ribofuranosa)

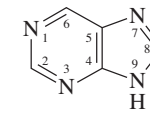


Desoxirribosa
(2-Desoxi-β-D-ribofuranosa)

B. Purinas y pirimidinas



Pirimidina



Purina

Figura 19.3 ▲
Estructuras químicas de la pirimidina y la purina.

Las bases que se encuentran en los nucleótidos son derivados de pirimidina o de purina (capítulo 18). Las estructuras de esos compuestos heterocíclicos, y los sistemas de numeración de los átomos de carbono y nitrógeno de cada base se muestran en la figura 19.3. La pirimidina tiene un solo anillo de cuatro átomos de carbono y dos de nitrógeno. La purina tiene un sistema de anillos fundidos de pirimidina y de imidazol. Los dos tipos de bases son no saturados, con dobles enlaces conjugados. Esta propiedad hace que los anillos sean planos, y también explica su capacidad de absorber la luz ultravioleta.

Las purinas y pirimidinas sustituidas son ubicuas en las células vivas, pero casi nunca se encuentran las bases no sustituidas en los sistemas biológicos. Las principales pirimidinas que hay en los nucleótidos son uracilo (2,4-dioxopirimidina, U), timina (2,4-dioxo-5-metilpirimidina, T) y citosina (2-oxo-4-aminopirimidina, C). Las principales purinas son adenina (6-aminopurina, A) y guanina (2-amino-6-oxopurina, G). Las estructuras químicas de esas cinco bases principales se ven en la figura 19.4. Nótese que como la timina es una forma sustituida de uracilo, también se puede llamar 5-metiluracilo. La adenina, la guanina y la citosina están en ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos. El uracilo se encuentra principalmente en ribonucleótidos y la timina en desoxirribonucleótidos.

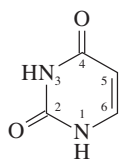
Las purinas y las pirimidinas son bases débiles relativamente insolubles en agua al pH fisiológico. Sin embargo, dentro de las células la mayor parte de bases pirimidina y purina se encuentran como constituyentes de nucleótidos y polinucleótidos, compuestos que son muy hidrosolubles.

Cada base heterocíclica de los nucleótidos comunes puede existir cuando menos en dos formas tautómeras. La adenina y la citosina (que son amidinas cíclicas) pueden existir en sus formas amino o imino, y la guanina, timina y uracilo (que son amidas cíclicas) pueden existir en forma de lactama (ceto) o de lactima (enol) (figura 19.5, página siguiente). Las formas tautómeras de cada base existen en equilibrio, pero los tautómeros amino y lactama son más estables, y en consecuencia predominan bajo las condiciones que hay en el interior de la mayoría de las células. Los anillos permanecen no saturados y planos en cada tautómero.

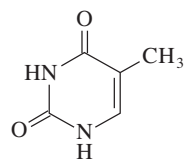
Todas las bases en los nucleótidos comunes pueden participar en puentes de hidrógeno. Los grupos amino de la adenina y la citosina son donadores de hidrógeno y los átomos de nitrógeno en el anillo (N-1 en la adenina y N-3 en la citosina) son aceptores de hidrógeno (figura 19.6, página 587). La citosina también tiene un grupo aceptor de hidrógeno en el C-2. La guanina, la citosina y la timina pueden formar tres puentes de hidrógeno. En la guanina, el grupo en el C-6 es aceptor de hidrógeno, y el N-1 y el grupo

◀Figura 19.4
Estructuras químicas de las principales pirimidinas y purinas.

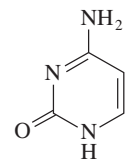
PIRIMIDINAS



Uracilo
(2,4-Dioxopirimidina)

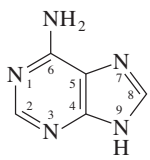


Timina
(2,4-Dioxo-5-metilpirimidina)

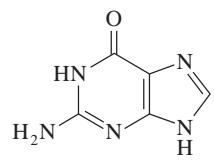


Citosina
(2-Oxo-4-aminopirimidina)

PURINAS



Adenina
(6-Aminopurina)



Guanina
(2-Amino-6-oxopurina)

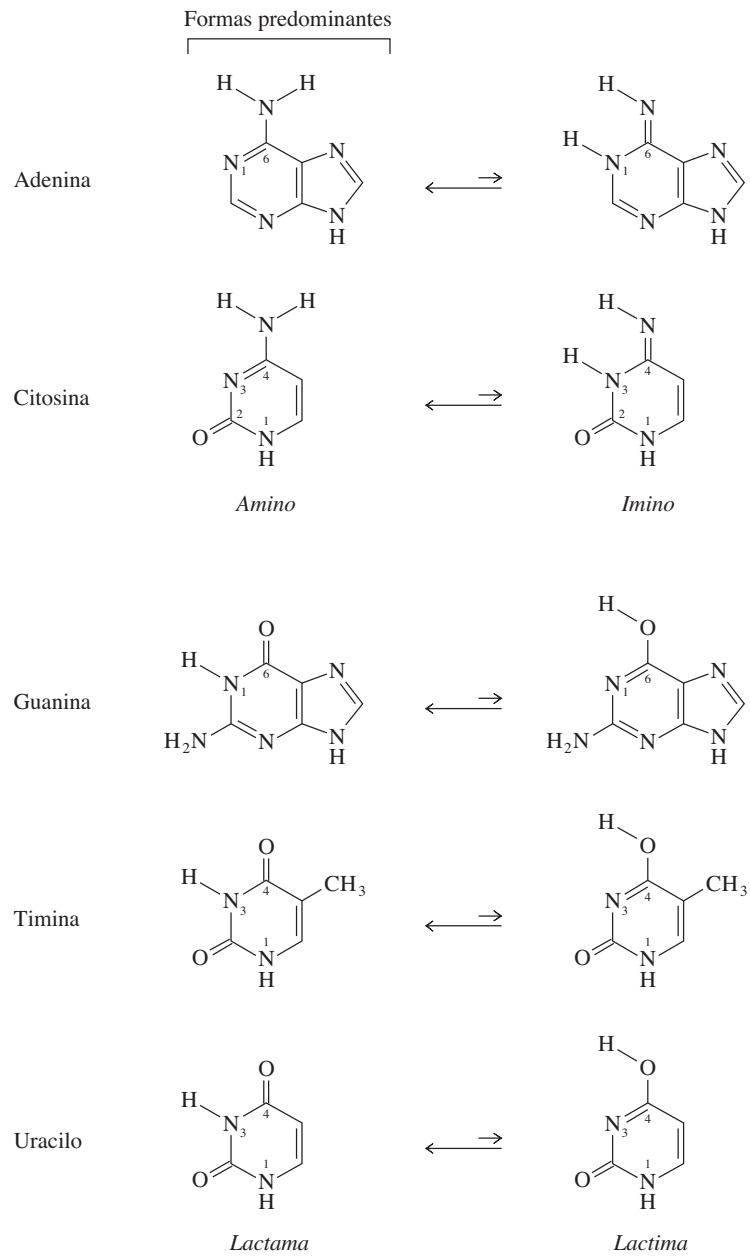
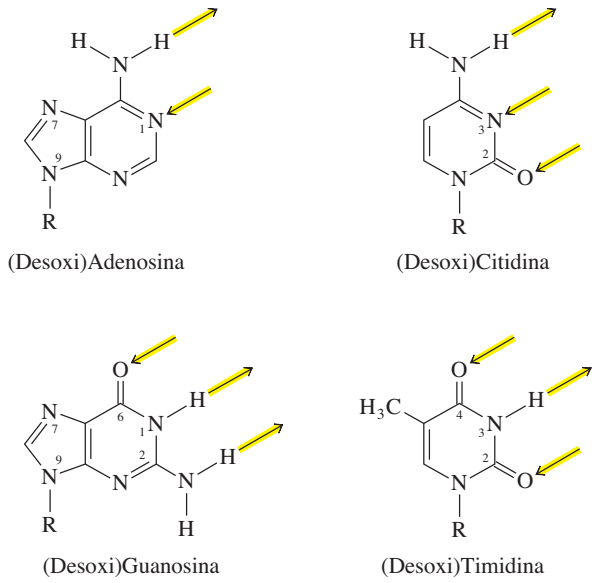


Figura 19.5 ▶
Tautómeros de adenina, citosina, guanina, timina y uracilo. A pH fisiológico, los equilibrios de esas reacciones de tautomerización están más hacia la dirección de las formas aminoácido y lactama.

amino en el C-2 son donadores de hidrógeno. En la timina, los grupos en el C-4 y el C-2 son aceptores de hidrógeno, y el N-3 es donador de hidrógeno. (Sólo dos de esos sitios, el C-4 y el N-3, se usan para formar pares de bases en el ADN). La capacidad formadora de puente de hidrógeno del uracilo, nucleósido que se encuentra en el ARN, es parecida a la de la timina. Las pautas de puentes de hidrógeno de las bases tienen consecuencias importantes para la estructura tridimensional de los ácidos nucleicos. Hay más puentes de hidrógeno en algunos ácidos nucleicos, y en interacciones entre ácido nucleico y proteína. Por ejemplo, el N-7 de la adenina y la guanina puede ser un aceptor de hidrógeno, y los dos átomos de hidrógeno del amino en adenina, guanina y citosina se pueden donar para formar puentes de hidrógeno.

C. Nucleósidos

Los nucleósidos están formados por ribosa y desoxirribosa y una base heterocíclica. En cada nucleósido, un enlace *β-N*-glicosídico conecta el C-1 del azúcar al N-1 de la pirimidina



◀Figura 19.6
Sitios para enlaces de hidrógeno en las bases de ácidos nucleicos. Cada base contiene átomos y grupos funcionales que pueden ser donadores o aceptores de hidrógeno. Se muestran las formas tautoméricas comunes de las bases. Los grupos donadores y aceptores de hidrógeno difieren en los otros tautómeros. R representa la parte de azúcar.

o al N-9 de la purina. Por consiguiente, los nucleósidos son derivados *N*-ribosilo o *N*-desoxirribosilo de las pirimidinas o las purinas. La convención de numeración para los átomos de carbono y nitrógeno de los nucleósidos refleja que están formados por una base y un azúcar de cinco carbonos, y cada uno de ellos tiene su propio esquema de numeración. La designación de los átomos en las partes de purina y pirimidina tiene preferencia. Por consiguiente, los átomos de las bases se numeran 1, 2, 3, etc., en tanto que los del anillo de furanosa se diferencian por tener primas (′). Así, el enlace *β*-*N*-glicosídico se une al átomo de C-1′, o 1′, de la parte del azúcar a la base. La ribosa y la desoxirribosa difieren en la posición del C-2′, o 2′. Las estructuras químicas de los principales ribonucleósidos y desoxirribonucleósidos se ven en la figura 19.7 de la página siguiente.

Los nombres de los nucleósidos se derivan de los de sus bases. El ribonucleósido que contiene adenina se llama adenosina (casi nunca se usa su nombre sistemático, 9-*β*-D-ribofuranosiladenina); su contraparte desoxi se llama desoxiadenosina. De igual modo, los ribonucleósidos de guanina, citosina y uracilo son guanosina, citidina y uridina, respectivamente. Los desoxirribonucleósidos de guanina, citosina y timina son desoxiguanosina, desoxicitidina y desoxitimidina, respectivamente. Como casi nunca hay timidina en los ribonucleósidos, a la desoxitimidina se le llama con frecuencia sólo timidina. También por lo común se usan las abreviaturas de una sola letra para las bases de pirimidina y purina para designar a los ribonucleósidos: A, G, C y U para adenosina, guanosina, citidina y uridina, respectivamente. Los desoxirribonucleósidos se abrevian dA, dG, dC y dT, cuando es necesario distinguirlos de los ribonucleósidos.

A veces está restringida la rotación de los enlaces glicosídicos en nucleósidos y nucleótidos. En los nucleósidos de purina, dos conformaciones, *syn* y *anti*, están en rápido equilibrio (figura 19.8, página siguiente). En los nucleósidos comunes de pirimidina predomina la conformación *anti*. En los ácidos nucleicos, que son polímeros de los nucleótidos, predominan las conformaciones *anti*.

D. Nucleótidos

Los nucleótidos son derivados fosforilados de los nucleósidos. Los ribonucleósidos contienen tres grupos hidroxilo que se pueden fosforilar (2′, 3′ y 5′), y los desoxirribonucleósidos contienen dos de esos grupos hidroxilo (3′ y 5′). En los nucleótidos naturales, los grupos fosforilo suelen estar unidos al átomo de oxígeno del grupo 5′-hidroxilo. Por convención, siempre se supone que un nucleótido es un éster de 5′-fosfato, a menos que se indique otra cosa.

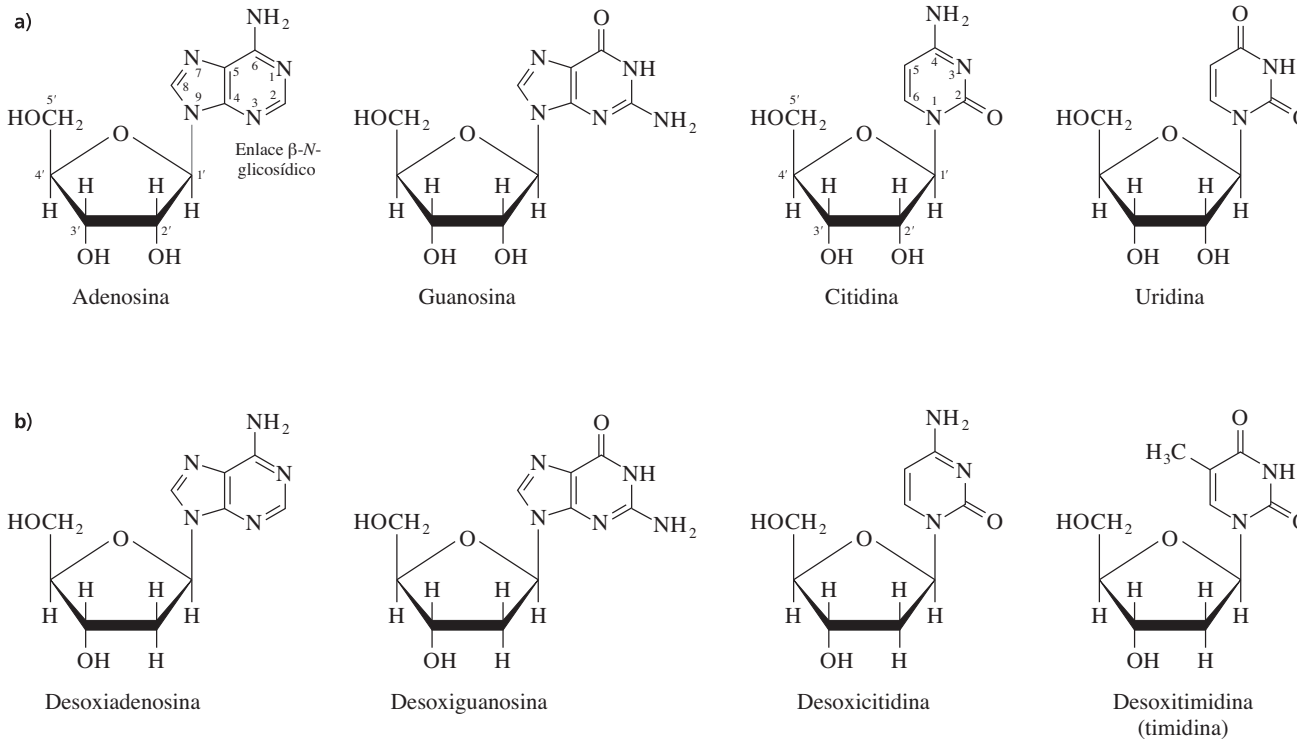
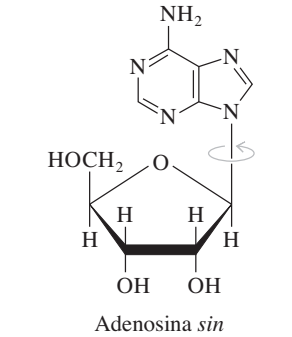


Figura 19.7 ▲
Estructuras químicas de los nucleósidos. Los átomos de carbono de los azúcares se numeran con primas, para distinguirlos de los átomos en las bases. **a)** Ribonucleósidos. El azúcar en los ribonucleósidos es la ribosa, que contiene un grupo hidroxilo en C-2′, como se ve aquí. El enlace β-N-glicosídico de la adenosina se muestra en gris. **b)** Desoxirribonucleósidos. En ellos hay un átomo adicional de hidrógeno en C-2′, en vez de un grupo hidroxilo.



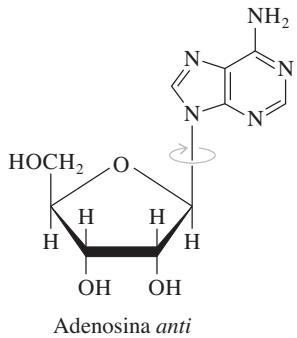


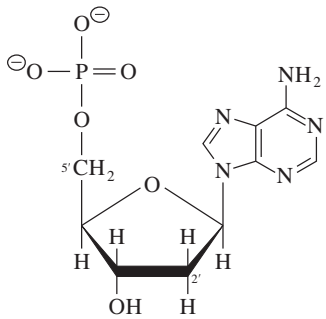
Figura 19.8 ▲
Conformaciones *sin* y *anti* de la adenosina. Algunos nucleósidos toman la conformación *sin* o *anti*. La forma *anti* suele ser más estable en los nucleósidos de pirimidina.

Los nombres sistemáticos de los nucleótidos indican la cantidad de grupos fosfato presentes. Por ejemplo, el éster 5′-monofosfato de la adenosina se llama adenosina monofosfato (AMP). También se le llama sólo adenilato. De igual modo, el éster 5′-monofosfato de la desoxicitidina se puede llamar desoxicitidina monofosfato (dCMP) o desoxicitidilato. El éster 5′-monofosfato del desoxirribonucleósido de timina se conoce como timidilato, pero a veces se le llama desoxitimidilato, para evitar ambigüedades. La tabla 19.1 presenta una perspectiva de la nomenclatura de bases, nucleósidos y 5′-nucleótidos. Los nucleótidos con el fosfato esterificado en la posición 5′ se abrevian AMP, dCMP, etcétera. Los nucleótidos con el fosfato esterificado en una posición distinta a la 5′ tienen abreviaturas similares, pero se indican los números de posición (por ejemplo 3′-AMP).

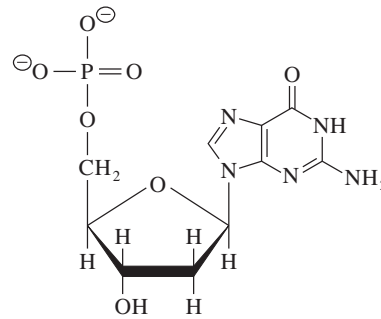
Los nucleósidos monofosfato, que son derivados del ácido fosfórico, son aniónicos a pH fisiológico. Son ácidos dibásicos con valores de pK_a aproximados entre 1 y 6. Los átomos de nitrógeno de los anillos heterocíclicos también se pueden ionizar.

Los nucleósidos monofosfato se pueden seguir fosforilando y formar nucleósidos difosfato y nucleósidos trifosfato. Esos grupos fosforilo adicionales existen como fosfoanhídridos. Las estructuras químicas de los desoxirribonucleósidos-5′-monofosfato se muestran en la figura 19.9. Una vista tridimensional de la estructura de la dGMP se ve en la figura 19.10. La base en la dGMP tiene la conformación *anti*, y el anillo de azúcar está fruncido. El plano del anillo de purina es casi perpendicular al del anillo de la furanosa. El grupo fosforilo unido al átomo de carbono 5′ está muy arriba del azúcar, y muy lejos de la base.

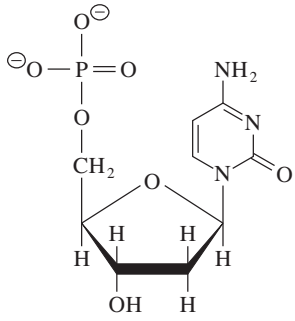
Los nucleósidos polifosfato y los polímeros de nucleótidos también se pueden abreviar usando un esquema en el que los grupos fosfato se representan con “p” y los nucleósidos se representan con sus abreviaturas de una letra. La posición de “p” en



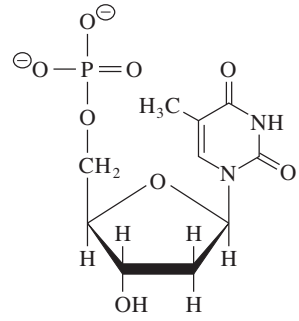
2′-Desoxiadenosina 5′-monofosfato
(Desoxiadenilato, dAMP)



2′-Desoxiguanosina 5′-monofosfato
(Desoxiguanilato, dGMP)



2′-Desoxicitidina 5′-monofosfato
(Desoxicitidilato, dCMP)



2′-Desoxitimidina 5′-monofosfato
(Timidilato, dTMP)

◀Figura 19.9
Estructuras químicas de los desoxirribonucleósido-5′-monofosfatos.

TABLA 19.1 Nomenclatura de bases, nucleósidos y nucleótidos

Base	Ribonucleósido	Ribonucleótido (5′-monofosfato)
Adenina (A)	Adenosina	Adenosina 5′-monofosfato (AMP); adenilato[a]
Guanina (G)	Guanosina	Guanosina 5′-monofosfato (GMP); guanilato[a]
Citosina (C)	Citidina	Citidina 5′-monofosfato (CMP); citidilato[a]
Uracilo (U)	Uridina	Uridina 5′-monofosfato (UMP); uridilato[a]
Base	**Desoxirribonucleósido**	**Desoxirribonucleótido (5′-monofosfato)**
Adenina (A)	Desoxiadenosina	Desoxiadenosina 5′-monofosfato (dAMP); desoxiadenilato[a]
Guanina (G)	Desoxiguanosina	Desoxiguanosina 5′-monofosfato (dGMP); desoxiguanilato[a]
Citosina (C)	Desoxicitidina	Desoxicitidina 5′-monofosfato (dCMP); desoxicitidilato[a]
Timina (T)	Desoxitimidina o timidina	Desoxitimidina 5′-monofosfato (dTMP); desoxitimidilato[a] o timidilato[a]

[a]Formas aniónicas de ésteres de fosfato que predominan al pH 7.4.

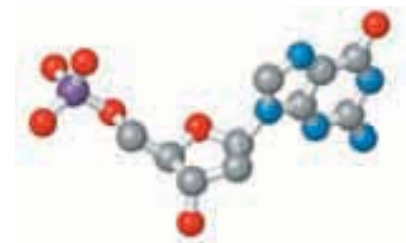


Figura 19.10 ▲
Desoxiguanosina-5′-monofosfato (dGMP). Se han omitido los átomos de hidrógeno para mayor claridad. Clave de colores: carbono = gris, nitrógeno = azul, oxígeno = rojo, fósforo = púrpura. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

relación con la abreviatura del nucleósido indica la posición del fosfato; para un 5′ fosfato la "p" precede a la abreviatura del nucleósido, y para un 3′ fosfato, la "p" sigue a la abreviatura del nucleósido. Así, 5′-adenilato (AMP) se puede abreviar pA, el 3′-desoxiadenilato como dAp y el ATP como pppA.

19.2 El ADN tiene doble hebra

Hacia 1950 estaba claro que el ADN es un polímero lineal de residuos de 2′-desoxirribonucleótido unidos por 3′,5′-fosfodiésteres. Erwin Chargaff había deducido ciertas regularidades en las composiciones de nucleótidos de muestras de ADN obtenidas de gran variedad de procariotas y eucariotas. Entre otras cosas, Chargaff observó que en el ADN de determinada célula están presentes A y T en cantidades equimolares, así como G y C. Un ejemplo de datos modernos de composición de ADN, donde se ven esas relaciones, se presenta en la tabla 19.2. Aunque A = T y G = C para cada especie, el porcentaje molar total de (G + C) puede diferir mucho del de (A + T). El ADN de algunos organismos, como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, es relativamente escaso en (G + C), en tanto que el de otros organismos, como la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, rico en (G + C). En general, los ADN de especies estrechamente relacionadas, como vacas, cerdos y humanos, tienen composiciones parecidas de bases. En el ADN de todas las especies, la relación de purinas a pirimidinas siempre es 1:1.

El modelo de ADN propuesto por Watson y Crick en 1953 se basó en las estructuras conocidas de los nucleósidos, sobre figuras de difracción de rayos X que obtuvieron Rosalind Franklin y Maurice Wilkins de fibras de ADN, y en las equivalencias químicas notadas por Chargaff. El modelo de Watson-Crick explicó las cantidades iguales de purinas y pirimidinas al sugerir que el ADN tiene doble hebra (doble cadena) y que las bases en una hebra se apareaban en forma específica con las bases de la otra: A con T y G con C. La estructura propuesta por Watson y Crick se llama hoy conformación B del ADN, o simplemente B-ADN.

Es importante apreciar la estructura del ADN para comprender los procesos de su replicación (capítulo 20) y transcripción (capítulo 21). El ADN es el almacén de la información biológica. Cada célula contiene docenas de enzimas y proteínas que se unen al ADN y reconocen ciertas propiedades estructurales, como la secuencia de nucleótidos. En las secciones que siguen se verá cómo la estructura del ADN permite que esas proteínas tengan acceso a la información almacenada.

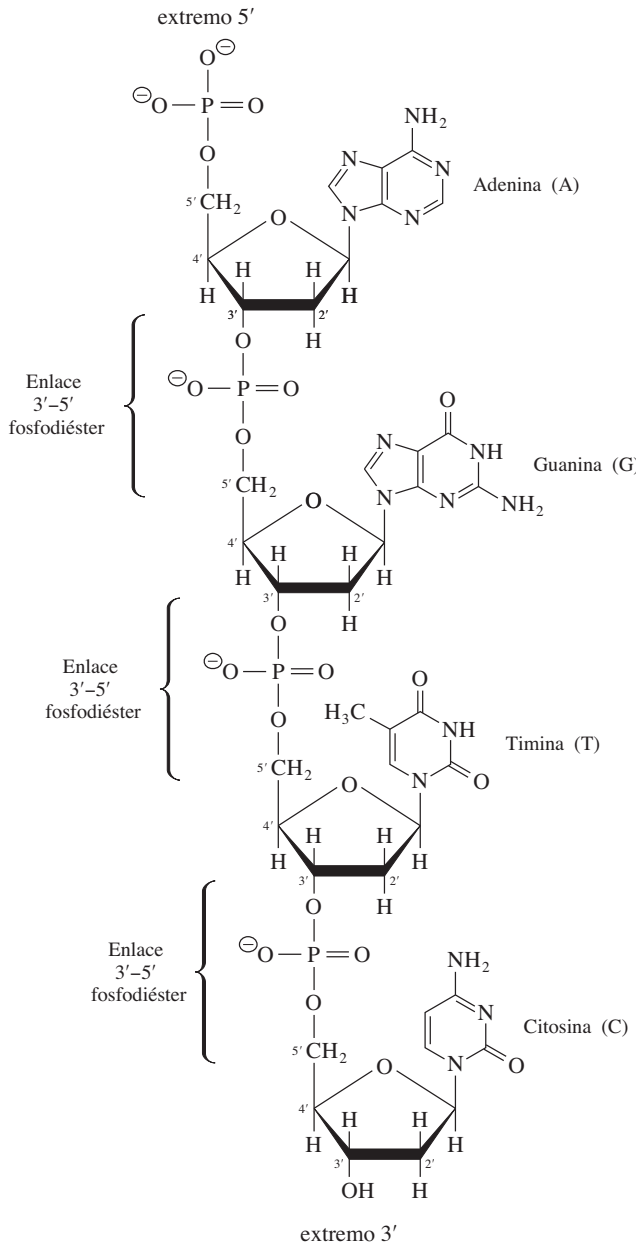
A. Unión de nucleótidos por enlaces de 3′,5′fosfodiéster

Se ha visto que la estructura primaria de una proteína se refiere a la secuencia de sus residuos de aminoácido unidos por enlaces peptídicos; en forma parecida, la estructura primaria de un ácido nucleico es la secuencia de sus residuos de nucleótido unidos por enlaces 3′,5′-fosfodiéster. Un tetranucleótido que representa un segmento de una cadena de ADN ilustra esos enlaces (figura 19.11). El esqueleto de la cadena de polinucleótidos consiste en los grupos fosforilo y los átomos de carbono 3′, 4′ y 5′, y el átomo de oxígeno 3′ de cada desoxirribosa. Como se ve en la figura 19.10, esos átomos del esqueleto están arreglados en una conformación extendida. Eso hace que el ADN de

TABLA 19.2 Composición de ADN en bases (mol %) y relaciones de las bases

Procedencia	A	G	C	T	A/T[a]	G/C[a]	(G + C)	Purina/ pirimidina[a]
Escherichia coli	26.0	24.9	25.2	23.9	1.09	0.99	50.1	1.04
Mycobacterium tuberculosis	15.1	34.9	35.4	14.6	1.03	0.99	70.3	1.00
Levadura	31.7	18.3	17.4	32.6	0.97	1.05	35.7	1.00
Vaca	29.0	21.2	21.2	28.7	1.01	1.00	42.4	1.01
Cerdo	29.8	20.7	20.7	29.1	1.02	1.00	41.4	1.01
Humana	30.4	19.9	19.9	30.1	1.01	1.00	39.8	1.01

[a] Las desviaciones respecto a la relación 1:1 se deben a variaciones experimentales.



◀Figura 19.11
Estructura química del tetranucleótido pdApdGpdTpdC. Los residuos de nucleótido están unidos por enlaces 3′-5′-fosfodiéster. El nucleósido con un grupo 5′-fosforilo libre se llama extremo 5′, y el nucleótido con un grupo 3′-hidroxilo libre se llama extremo 3′.

doble cadena sea una molécula larga y delgada, a diferencia de las cadenas de polipéptido que con facilidad se pueden doblar sobre sí mismas hacia atrás.

Todos los residuos de nucleótido dentro de una cadena de polinucleótido pueden tener la misma orientación. Entonces, las cadenas de polinucleótido tienen direccionalidad, igual que las de polipéptido. Se dice que un extremo de una cadena lineal de polinucleótido es 5′ (porque no hay residuo unido a su carbono 5′) y que el otro es 3′ (porque no hay residuo unido a su átomo de carbono 3′). Por convención, la dirección de una hebra de ADN se define leyendo los átomos que forman el residuo de azúcar. Así, al ir de arriba abajo de la hebra en la figura 19.11, se define como 5′ → 3′ (“cinco prima a tres prima”) porque se cruza el residuo de azúcar encontrando los carbonos 5′, 4′ y 3′ en ese orden. De igual modo, al ir de abajo arriba de la hebra quiere decir moverse en la dirección 3′ → 5′.

Se supone que las abreviaturas estructurales se leen en dirección 5′ → 3′, a menos que se indique otra cosa. Como los fosfatos se pueden abreviar con p, el tetranucleótido

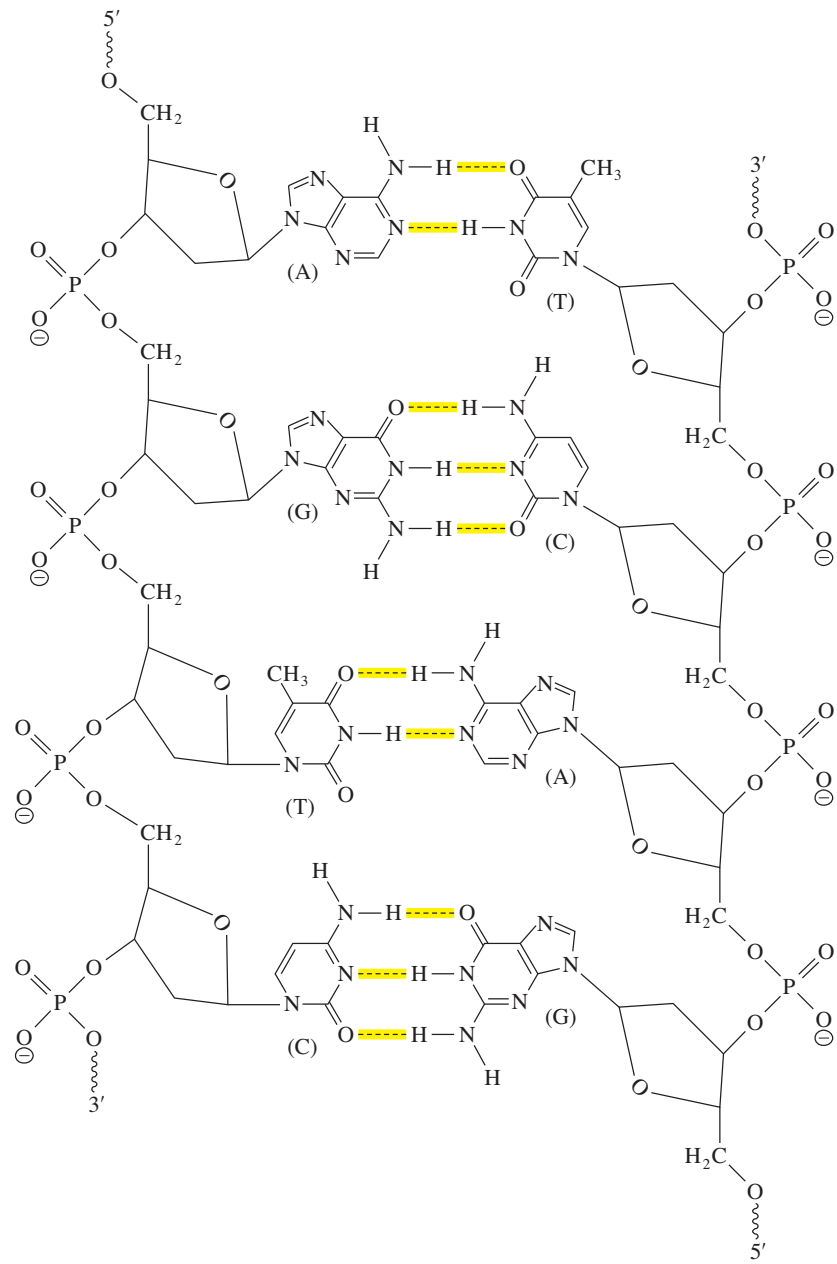
de la figura 19.11 se puede representar por pdApdGpdTpdC, o incluso como AGTC, cuando es claro que se refiere al ADN.

Cada grupo fosfato que participa en un enlace fosfodiéster tiene un pK_a aproximado de 2, y una carga negativa a pH neutro. En consecuencia, los ácidos nucleicos son polianiones bajo las condiciones fisiológicas. Dentro de la célula, los grupos fosfato con carga negativa se neutralizan con pequeños cationes y con proteínas con carga positiva.

B. Formación de una doble hélice con dos hebras antiparalelas

La mayor parte de las moléculas de ADN consisten de dos hebras, de polinucleótidos. Cada una de las bases en una hebra forma puentes de hidrógeno con una base de la hebra opuesta (figura 19.12). Los pares de bases más comunes están entre los tautómeros lactama y amino de las bases. La guanina se aparea con citosina y la adenina con timina, maximizando los puentes de hidrógeno entre sitios potenciales. Entonces, los pares

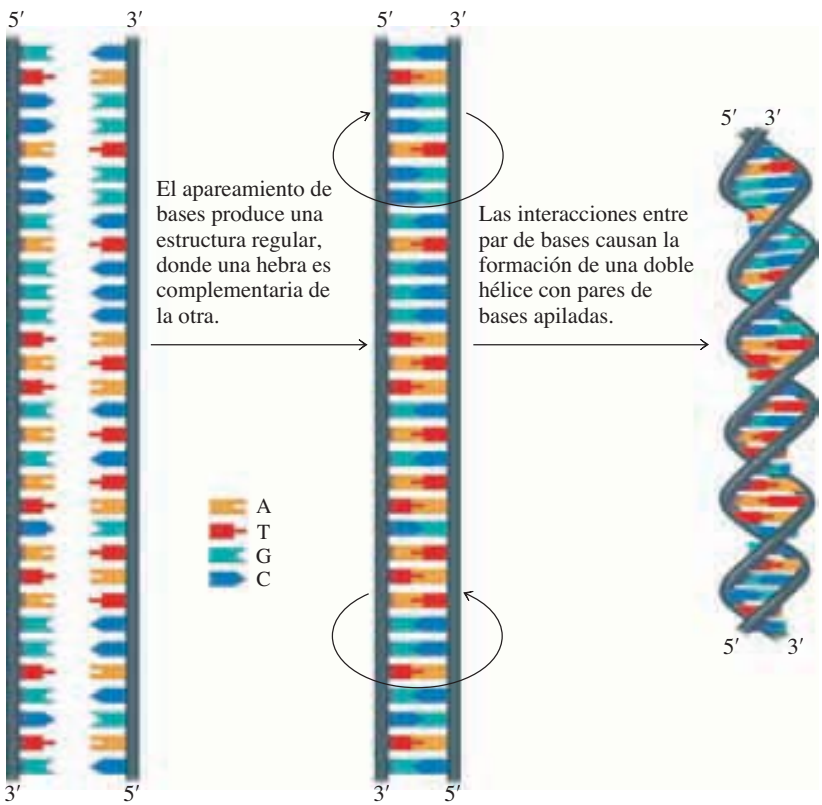
Figura 19.12 ▶
Estructura química del ADN de doble hebra. Las dos cadenas corren en direcciones opuestas. La adenina en una hebra se aparea con la timina en la hebra opuesta, y la guanina se aparea con citosina.



de bases G/C tienen tres puentes de hidrógeno, y los pares de bases A/T tienen dos. Esta propiedad del ADN de doble hebra explica el descubrimiento de Chargaff, de que la relación de A con T y de G con C es 1:1 para una gran variedad de moléculas de ADN. Como A en una hebra se aparea con T en la otra, y G se aparea con C, las hebras son complementarias, y una puede servir como plantilla para la otra.

Los esqueletos de azúcar-fosfato en las hebras complementarias de ADN de doble hebra tienen orientaciones opuestas. En otras palabras, son antiparalelas. Cada extremo del ADN de doble hebra está formado por el extremo 5′ de una hebra y el extremo 3′ de la otra. En el ADN de doble hebra, la distancia entre dos esqueletos de azúcar-fosfato es igual para cada par de bases. En consecuencia, todas las moléculas de ADN tienen la misma estructura regular, a pesar de que puedan ser muy diferentes sus secuencias de nucleótidos. La estructura real del ADN difiere de la de la figura 19.12 en dos aspectos importantes. En una representación tridimensional real, las dos cadenas se enrollan entre sí para formar una estructura helicoidal de doble hebra, o doble hélice. También, las bases se giran para que el plano de los pares de base sea casi perpendicular a la página. (Recuérdese que el plano de la base en la dGMP es casi perpendicular al del azúcar, como se ve en la figura 19.10).

La molécula de ADN se puede visualizar como una "escalera" que se ha torcido para formar una hélice. Las bases apareadas representan los peldaños de la escalera, y los esqueletos de azúcar-fosfato representan los soportes. Cada hebra complementaria sirve como una plantilla perfecta a la otra. Esta complementariedad es responsable de la regularidad general de la estructura del ADN de doble hebra. Sin embargo, el apareamiento de bases complementarias solo no produce una hélice. En el B-ADN, los pares de bases se apilan uno sobre otro, y son casi perpendiculares al eje longitudinal de la molécula. Las interacciones no covalentes cooperativas entre las superficies superior e inferior de cada par de base acercan entre sí a esos pares y crean un interior hidrofóbico que hace que se tuerza el esqueleto de azúcar-fosfato. Son esas interacciones de apilamiento las que crean la conocida hélice (figura 19.13). Gran parte de la estabilidad del ADN de doble hebra se debe a las interacciones de apilamiento entre los pares de bases.



◀Figura 19.13
Apareamiento e interacción de bases complementarias en ADN de doble hebra. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

Debido a que los dos esqueletos hidrofílicos de azúcar-fosfato se enrollan en torno al exterior de la hélice, quedan expuestos al ambiente acuoso. En contraste, las bases apiladas, relativamente hidrofóbicas, están en el interior de la hélice, donde son muy inaccesibles para el agua. Este ambiente hidrofóbico hace que los puentes de hidrógeno entre las bases sean más estables, porque están protegidos contra la competencia de moléculas de agua.

La doble hélice tiene dos surcos de ancho desigual, por la forma en que se apilan los pares de bases y en que se tuercen los esqueletos de azúcar-fosfato. Esos surcos se llaman **surco mayor** y **surco menor** (figura 19.14). Dentro de cada surco, los grupos funcionales en las orillas de los pares de bases quedan expuestos al agua. Cada par de bases tiene una pauta distintiva de grupos químicos en los surcos. Como los pares de bases son accesibles en los surcos, las moléculas que interactúan con determinados pares de bases pueden identificarlos sin alterar la hélice. Esto tiene importancia particular en las proteínas que deben unirse al ADN de doble hebra y "leer" determinada secuencia.

El B-ADN es una hélice derecha con 2.37 nm de diámetro. El **ascenso** de la hélice es la distancia entre un par de bases y el siguiente, a lo largo del eje de la hélice, y es de 0.33 nm en promedio; el **paso** de la hélice es la distancia para completar una vuelta, aproximadamente 3.40 nm. Esos valores varían dentro de ciertos límites que dependen de la composición en bases. Ya que hay unos 10.4 pares de bases por vuelta de la hélice, el ángulo de rotación entre nucleótidos adyacentes en cada hebra es de unos 34.6° (360/10.4).

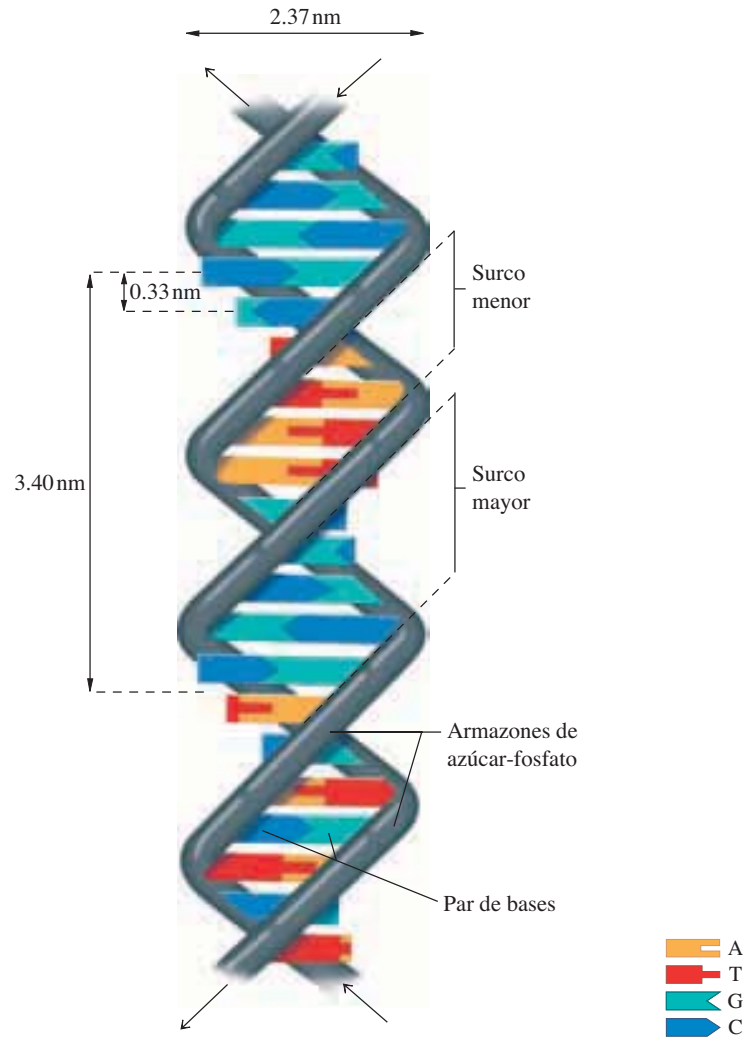
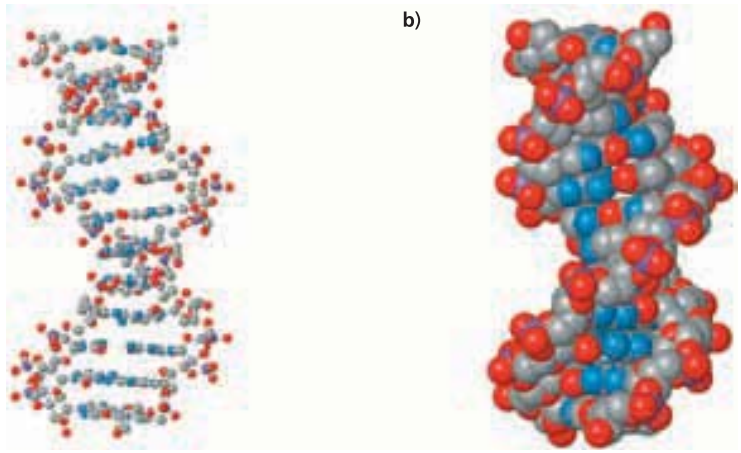


Figura 19.14 ▶
Estructura tridimensional de B-ADN. Este modelo muestra la orientación de los pares de bases y la columna vertebral de azúcar-fosfato, así como los tamaños relativos de las bases de pirimidina y purina. La columna vertebral de azúcar-fosfato se enrolla en torno al exterior de la hélice y las bases ocupan el interior. El apilamiento de los pares de bases forma dos hendiduras de ancho desigual, los surcos mayor y menor. El diámetro de la hélice es 2.37 nm y la distancia entre pares de bases es 0.33 nm. La distancia para completar una vuelta es 3.40 nm. (Para mayor claridad, se ha dejado algo de espacio entre los pares de bases apilados, y las interacciones entre las bases complementarias se muestran en forma esquemática). (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).



◀Figura 19.15
B-ADN. **a)** Modelo de bolas y palillos. Los pares de bases son casi perpendiculares a las columnas vertebrales de azúcar-fosfato. **b)** Modelo de relleno espacial. Clave de colores: carbono = gris, nitrógeno = azul, oxígeno = rojo, fósforo = púrpura. (Nucleic Acids Database BD0001]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

En la figura 19.15 se presentan dos vistas del B-ADN. El modelo de bolas y palillos (figura 19.15a) muestra que los puentes de hidrógeno entre pares de bases están sepultados en el interior de la molécula, donde quedan protegidos contra interacciones competitivas con el agua. Los grupos fosfato con carga (átomos púrpura y rojo) están en la superficie externa. Este arreglo se aprecia más en el modelo de relleno espacial (figura 19.15b). El modelo de relleno espacial también muestra que los grupos funcionales de los pares de bases están expuestos en los surcos. Esos grupos se pueden identificar por la presencia de átomos de nitrógeno azules y átomos de oxígeno, rojos.

La longitud de las moléculas de ADN de doble hebra se expresa con frecuencia en términos de pares de bases (pb). Por comodidad, las estructuras más largas se miden en miles de pares de bases o **kilopares de bases**, que se abrevian kb. La mayor parte de los genomas bacterianos consisten en una sola molécula de ADN de varios miles de kb; por ejemplo, el cromosoma de *Escherichia coli* tiene 4 600 kb. Las moléculas más grandes de ADN en los cromosomas de mamíferos y plantas de floración pueden ser de varios cientos de miles de kb de longitud. El genoma humano contiene 3 200 000 kb (3.2×109 pares de bases) de ADN.

En general, las bacterias contienen un solo cromosoma, cuyos extremos están unidos para formar una molécula circular. El ADN en las mitocondrias y los cloroplastos de las células eucarióticas también es circular. En contraste, los cromosomas en el núcleo de una célula eucariótica son lineales. Algunas bacterias también tienen varios cromosomas, y otras tienen cromosomas lineales.

C. Estabilización de la doble hélice por fuerzas débiles

Las fuerzas que mantienen las conformaciones nativas de las estructuras celulares complejas tienen la fuerza suficiente para mantener las estructuras, pero la debilidad suficiente para permitir que haya flexibilidad de conformación. Los enlaces covalentes entre los residuos adyacentes determinan las formas tridimensionales de esas macromoléculas. Hay cuatro clases de interacciones que afectan la conformación del ADN de doble hebra.

1. *Interacciones de apilamiento* Los pares de bases apilados forman contactos de van der Waals. Aunque las fuerzas entre los pares de bases individuales apilados son débiles, son aditivas, por lo que en las moléculas grandes de ADN los contactos de van der Waals son una fuente importante de estabilidad.
2. *Puentes de hidrógeno*. Los puentes de hidrógeno entre pares de bases forman una importante fuerza estabilizadora.
3. *Efectos hidrofóbicos.* Al sepultar los anillos hidrofóbicos de purina y pirimidina en el interior de la doble hélice aumenta la estabilidad de la hélice.

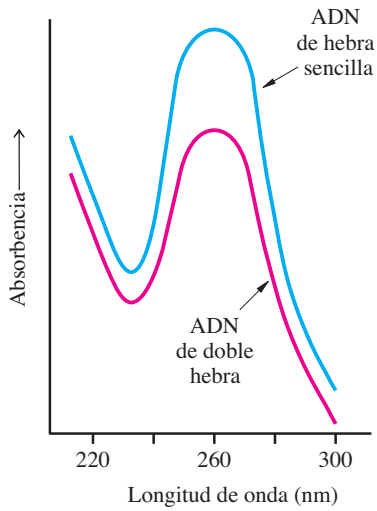


Figura 19.16 ▲
Espectros de absorción de ADN de doble hebra y de hebra sencilla. A pH 7.0, el ADN de doble hebra tiene un máximo de absorbencia cercano a 260 nm. El ADN desnaturalizado absorbe 12% a 40% más luz ultravioleta que el ADN de doble hebra.

4. *Interacciones entre cargas*. La repulsión electrostática de los grupos fosfato con carga negativa en el esqueleto es una fuente potencial de inestabilidad de la hélice de ADN. Sin embargo, la repulsión se minimiza por la presencia de cationes como Mg^{2+} y proteínas catiónicas (que contienen abundancia de los residuos básicos arginina y lisina).

Bajo condiciones fisiológicas, el ADN de doble hebra es termodinámicamente más estable que las hebras separadas, lo cual explica por qué predomina la forma de doble hebra in vivo. Sin embargo, a veces se puede alterar la estructura de regiones localizadas de la doble hélice al desenrollarse. Esa alteración sucede durante la replicación, reparación, recombinación y transcripción del ADN. Al desenrollamiento y la separación completos de las hebras individuales complementarias se le llama **desnaturalización.** La desnaturalización sólo sucede *in vitro*.

El ADN de doble hebra se puede desnaturalizar con calor o con un agente caotrópico, como urea o cloruro de guanidinio. (Recuérdese, de la sección 4.9, que también las proteínas se pueden desnaturalizar). En estudios de desnaturalización térmica se aumenta lentamente la temperatura de una solución de ADN. Al elevar la temperatura, se dispersan cada vez más bases y se rompen más puentes de hidrógeno entre pares de bases. Llega un momento en que las dos cadenas se separan por completo. La temperatura a la que la mitad del ADN se ha convertido en una sola cadena se le llama **punto de fusión,** T_m.

Para medir el grado de desnaturalización se usa la absorción de luz ultravioleta. Se hacen mediciones a una longitud de onda de 260 nm, cercana al máximo de absorbencia para los ácidos nucleicos. El ADN de una hebra absorbe 12 a 14% más luz que el ADN de doble hebra a 260 nm (figura 19.16). Una gráfica del cambio de absorbencia de una solución de ADN en función de la temperatura se llama **curva de fusión** (figura 19.17). La absorbencia aumenta en forma marcada en el punto de fusión, y la transición de ADN de doble hebra a una hebra se efectúa dentro de límites estrechos de temperatura.

La forma sigmoidal de la curva de fusión indica que la desnaturalización es un proceso cooperativo, como se vio en el caso de la desnaturalización de proteínas (sección 4.9). En este caso, la cooperatividad se debe al rápido desensamble de la molécula de doble hebra cuando se alteran las interacciones de apilamiento y los puentes de hidrógeno. El desensamble comienza con el desenrollamiento de un tramo interno corto de ADN, formando una "burbuja" de una hebra. Esta burbuja de una hebra desestabiliza rápidamente los pares apilados de bases, y esta desestabilización se propaga en ambas direcciones a medida que se expande la burbuja.

Como se ve en la figura 19.17, los poli(GC) se desnaturalizan a temperatura mucho mayor que los poli(AT). Es más fácil fundir ADN rico en A/T que ADN rico en G/C,

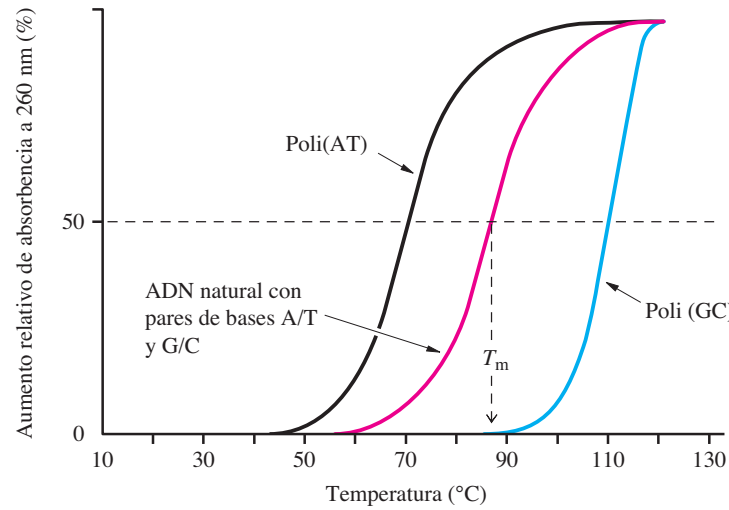
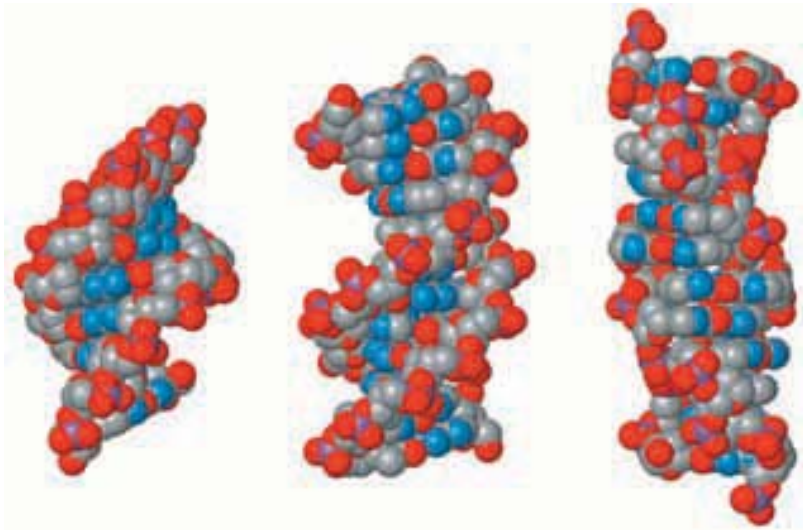


Figura 19.17 ▶
Curva de fusión del ADN. En este experimento se aumenta la temperatura de una solución de ADN mientras se vigila la absorbencia a 260 nM. El punto de fusión (*Tm*) corresponde al punto de inflexión de la curva sigmoidal, donde el aumento de absorbencia de la muestra es la mitad del aumento de absorbencia del ADN totalmente desnaturalizado. El poli(AT) se funde a menor temperatura que el ADN natural o el poli(GC), ya que se requiere más energía para desordenar los pares de bases G/C.



◀Figura 19.18
La conformación A-ADN (izquierda) se favorece cuando el ADN se deshidrata [NDB AD0001]. El B-ADN (centro) es la conformación que se encuentra en forma normal dentro de las células [NDB BD0001]. La conformación Z-ADN (derecha) se favorece en ciertas secuencias ricas en G/C [NDB ZDJ050]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

porque los pares de bases A/T tienen interacciones de apilamiento más débiles, y un puente de hidrógeno menos que los pares de bases G/C. El ADN natural es una mezcla de regiones con diversas composiciones de bases, pero las regiones ricas en A/T se desenrollan con más facilidad que las ricas en G/C. A temperaturas justo abajo del punto de fusión, una molécula típica de ADN contiene regiones de doble hebra que son ricas en G/C y regiones locales de una hebra ("burbujas") que son ricas en A/T. Esos experimentos *in vitro* demuestran algo importante, que es más fácil desenrollar regiones localizadas cuya secuencia consista principalmente en pares de bases A/T que en pares de bases G/C. En el capítulo 21 se verá que los sitios de iniciación para la transcripción a menudo son ricos en A/T.

D. Conformaciones de ADN de doble hebra

El ADN de doble hebra puede asumir distintas conformaciones bajo condiciones diferentes. Los estudios cristalográficos con rayos X de diversos oligodesoxirribonucleótidos sintéticos, de secuencia conocida, indican que las moléculas dentro de la célula no existen en una conformación B "pura". En vez de ello, el ADN es una molécula dinámica cuya conformación exacta depende hasta cierto grado de las secuencia de nucleótidos. La conformación local también se afecta por dobleces en la molécula de ADN, y de si está unida a una proteína. El resultado es que la cantidad de pares de bases por vuelta en el B-ADN puede fluctuar de 10.2 a 10.6.

Además de varias formas de B-ADN, hay dos conformaciones muy diferentes del ADN. Se forma A-ADN cuando se deshidrata el ADN, y se puede formar Z-ADN cuando están presentes ciertas secuencias (figura 19.18). (Las formas A y B de ADN fueron descubiertas por Rosalind Franklin en 1952). El A-ADN está enrollado más apretadamente que el B-ADN, y los surcos mayor y menor del A-ADN tienen ancho similar. Hay unos 11 pb por vuelta en el A-ADN, y los pares de bases están desplazados unos 20° en relación al eje mayor de la hélice. El Z-ADN difiere todavía más del B-ADN. En el Z-ADN no hay surcos y la hélice es izquierda, no derecha. La conformación Z-ADN está en regiones ricas en G/C. Los residuos de desoxiguanilato en el Z-ADN tienen distinta conformación de azúcares (3′-endo) y la base tiene la conformación *sin*. Tanto las conformaciones A-ADN como Z-ADN existen *in vivo*, pero se confinan a cortas regiones del ADN.

19.3 Superenrollamiento del ADN

Una molécula circular de ADN con la conformación B tiene un promedio de 10.4 pares de bases por vuelta. Se dice que está *relajada* si tal molécula puede reposar plana sobre una superficie. Esta doble hélice relajada se puede seguir envolviendo o desenvolviendo

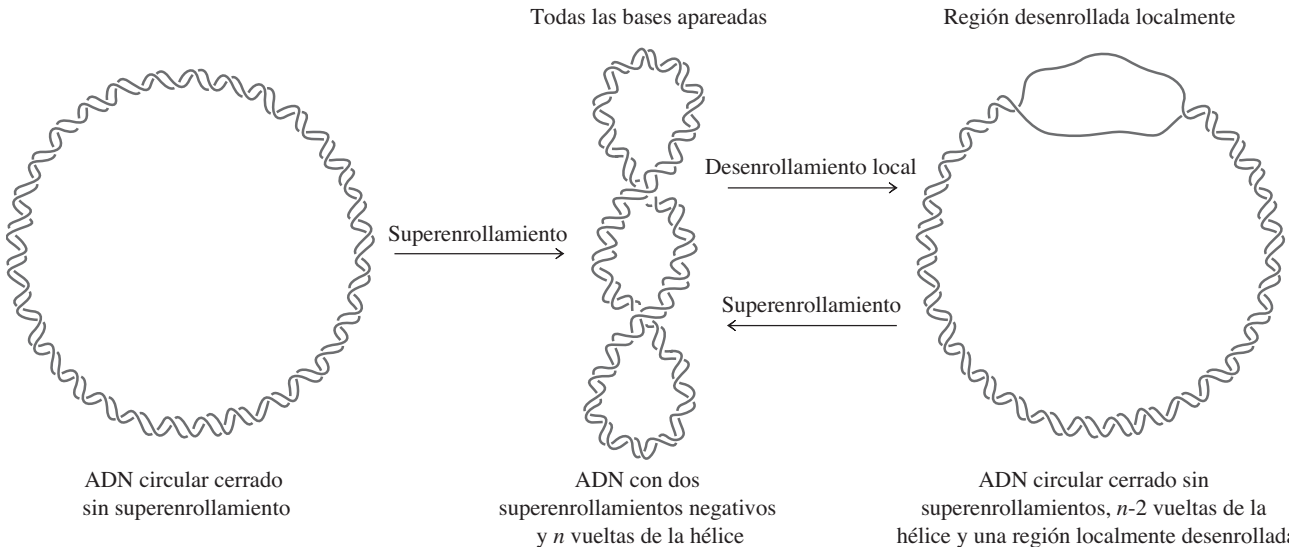


Figura 19.19 ▲
ADN superenrollado. La molécula de ADN a la izquierda es un círculo cerrado relajado, y tiene la conformación B normal. Al romper la hélice de ADN y desenrollarla dos vueltas antes de volver a formar el círculo se producen dos superenrollamientos. Estos superenrollamientos compensan el desenvolvimiento y restauran la conformación normal B. La molécula de la derecha tiene una región de ADN no enrollada localmente. Esta conformación equivale topológicamente a ADN superenrollado en forma negativa.

si se rompen las hebras del ADN y se tuercen los dos extremos de la molécula lineal en direcciones opuestas. Cuando se vuelven a unir las hebras para crear un círculo, ya no hay 10.4 pares de bases por vuelta, las necesarias para mantener la conformación B estable. La molécula circular se compensa por el envolvimiento o desenvolvimiento formando superenrollamientos que restauran 10.4 pares de bases por vuelta de la doble hélice (figura 19.19). Una molécula superenrollada de ADN no quedaría plana en una superficie. Cada superenrollamiento se compensa por una vuelta de la doble hélice.

La mayor parte de las moléculas de ADN circular están superenrrolladas en las células, pero hasta las moléculas lineales largas de ADN contienen regiones localmente sobretorcidas. Los cromosomas bacterianos, en forma típica, tienen unos cinco superenrollamientos por 1 000 pares de bases de ADN. Según se verá en la sección 19.5, el ADN en los núcleos de las células eucarióticas también está sobretorcido. Todos los organismos tienen enzimas que pueden romper al ADN, destorcer o sobretorcer la doble hélice y volver a unir las hebras para alterar la topología. Esas enzimas se llaman **topoisomerasas,** y se encargan de agregar y eliminar superenrollamientos. En la figura 19.20 se ve un ejemplo de una topoisomerasa unida a ADN. Estas notables enzimas rompen una o las dos hebras del ADN, desenvolviendo o envolviendo el ADN girando los extremos separados y los vuelven a unir, para crear (o eliminar) superenrollamientos.

Una de las consecuencias importantes del superenrollamiento se ve en la figura 19.19. Si se destuerce el ADN, se compensa formando superenrollamientos negativos para mantener la conformación estable B. (El sobre-envolvimiento produce superenrollamientos positivos.) En la parte derecha de la figura 19.19 se ve una conformación alternativa; en ella, la mayor parte del ADN es de doble hebra, pero hay una región local no torcida debida al ligero desenvolvimiento. Las conformaciones superenrolladas en forma negativa y desenvueltas localmente están en equilibrio con la forma superenrollada en exceso, porque es un poco más estable. La diferencia en energía libre entre las dos conformaciones es bastante pequeña.

La mayor parte del ADN en una célula está superenrrollado negativamente. Eso quiere decir que es relativamente fácil destorcer regiones cortas de la molécula, en especial aquellas que son ricas en A/T. Como se dijo antes, el desenvolvimiento localizado es un paso esencial en el inicio de la replicación, recombinación, reparación y transcripción

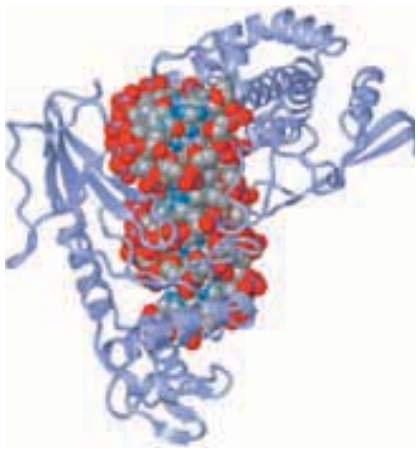


Figura 19.20 ▲
Topoisomerasa I humana (Homo sapiens) unida a ADN. [PDB 1A31]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

del ADN. Así, el superenrollamiento negativo tiene un papel biológico importante en esos procesos, porque almacena la energía necesaria para el desenvolvimiento local. Es la causa de que las topoisomerasas, que catalizan el superenrollamiento, sean enzimas esenciales en todas las células.

19.4 Diversos tipos de ARN en las células

Las moléculas de ARN participan en varios procesos asociados a la expresión génica. Esas moléculas se encuentran en copias múltiples y en varias formas distintas dentro de una célula dada. Hay cuatro clases principales de ARN en todas las células vivas:

1. *ARN ribosómico* (ARNr); moléculas que son parte integral de los ribosomas (ribonucleoproteínas intracelulares que son sitios de síntesis de proteínas). El ARN ribosómico es la clase más abundante de ácido ribonucleico, que forma 80% del ARN celular total.
2. *ARN de transferencia* (ARNt); son moléculas que llevan a los aminoácidos activados a los ribosomas para su incorporación a las cadenas de péptidos en crecimiento durante la síntesis de proteínas. Las moléculas de ARNt sólo tienen de 73 a 95 residuos de nucleótidos de longitud. Forman un 15% del ARN celular total.
3. *ARN mensajero*(ARNm); moléculas que codifican las secuencias de aminoácidos en las proteínas. Son los "mensajeros" que llevan la información del ADN al complejo de traducción, donde se sintetizan las proteínas. En general, el ARNm sólo forma el 3% del ARN celular total. Estas moléculas son las menos estables de los ácidos ribonucleicos celulares.
4. *ARN pequeño;* moléculas presentes en todas las células. Algunas moléculas pequeñas de ARN tienen actividad catalítica o contribuyen a la actividad catalítica, asociadas a proteínas. Muchas de esas moléculas de ARN se relacionan con eventos de procesamiento que modifican al ARN después de que se ha sintetizado.

Los ARN son moléculas de una hebra, pero con frecuencia tienen estructura secundaria compleja. Bajo condiciones fisiológicas, la mayor parte de los polinucleótidos de una cadena se doblan hacia atrás sobre sí mismos para formar regiones estables de ARN de doble hebra, con bases apareadas. Un tipo de estructura secundaria es un lazo en horquilla, que se forma cuando regiones cortas de secuencia complementaria forman pares de bases (figura 19.21, página siguiente). La estructura de las regiones de doble hebra de esos lazos en horquilla se parece a la estructura de la forma A del ADN de doble hebra. Como se verá en los capítulos 21 y 22, esas estructuras son importantes en la transcripción, y son características comunes en el ARN de transferencia, ARN ribosómico y en los ARN pequeños.

19.5 Empaquetamiento del ADN en cromatina, en células eucariotas

En 1879, 10 años después del descubrimiento de la nucleína por Miescher, Walter Flemming observó objetos en banda, en núcleos teñidos de células eucarióticas. Llamó **cromatina,** al material, de *chroma*, que significa "color" en griego. Hoy se sabe que la cromatina consiste en ADN con varias proteínas que empacan al ADN en una forma más compacta. El ADN procariótico también se asocia a proteínas para formar estructuras condensadas dentro de la célula. Esas estructuras son distintas a las observadas en los eucariotas, y en general no se les llama cromatina.

En una célula normal en reposo, la cromatina tiene forma de hilos largos y esbeltos, de unos 30 nm de diámetro; se llaman fibras de 30 nm. En los humanos, el núcleo debe contener 46 de esas fibras de cromatina, o cromosomas. Como el mayor cromosoma

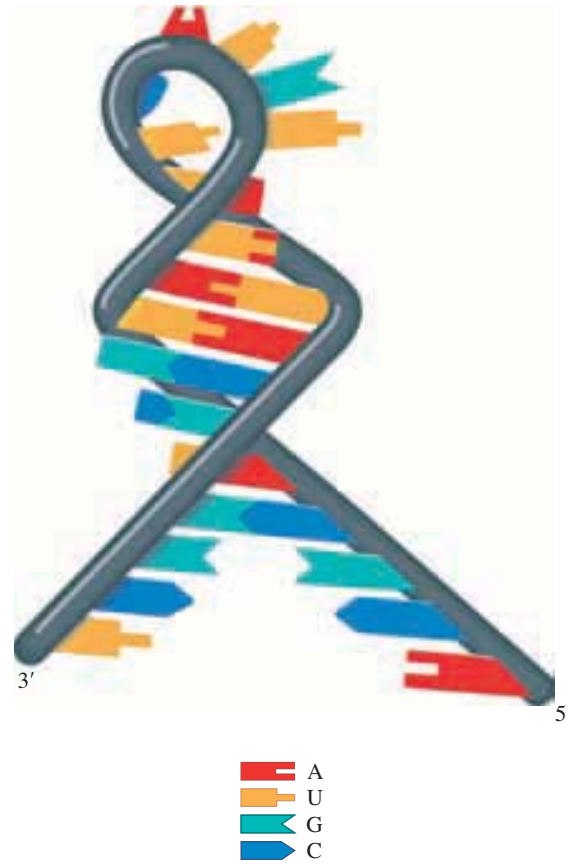


Figura 19.21 ▶
Estructuras de lazo en la horquilla en el ARN. Los polinucleótidos de una hebra, como ARN, pueden formar lazos en horquillas, u horquillas, cuando regiones cortas de secuencias complementarias forman pares de bases. El tallo de la estructura consiste en nucleótidos con bases apareadas, y el lazo consiste en nucleótidos no complementarios. Nótese que las cadenas en el tallo son antiparalelas. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

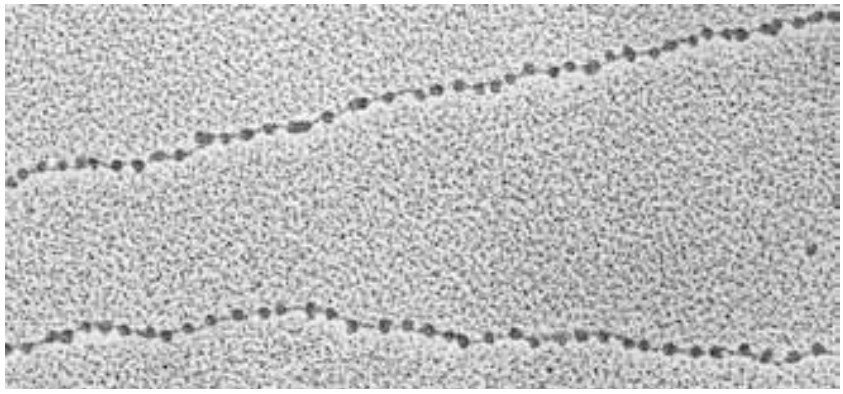
humano tiene unos 2.4 × 108 pb, tendría unos 8 cm de largo si se estirara en la conformación B. Durante la metafase (cuando los cromosomas están más condensados), el cromosoma mayor tiene unos 10 μm de longitud. La diferencia entre la longitud del cromosoma en metafase y la forma extendida B de ADN es de 8 000 veces. A este valor se le llama *índice de empacamiento*.

A. Nucleosomas

Las proteínas principales de la cromatina se llaman **histonas.** La mayoría de las especies eucarióticas tienen cinco histonas distintas, llamadas H1, H2A, H2B, H3 y H4. Las cinco histonas son proteínas pequeñas y básicas, que contienen numerosos residuos de lisina y arginina, cuyas cargas positivas permiten que las proteínas se unan al esqueleto de azúcar-fosfato, con carga negativa, del ADN. Las cantidades de residuos ácidos y básicos en las histonas de mamíferos típicas se anotan en la tabla 19.3. A excepción de la

TABLA 19.3 Residuos básicos y ácidos en histonas de mamíferos

Tipo	Peso molecular	Cantidad de residuos	Cantidad de residuos básicos	Cantidad de residuos ácidos
H1 en timo de conejo	21 000	213	65	10
H2A en timo de becerro	14 000	129	30	9
H2B en timo de becerro	13 800	125	31	10
H3 en timo de becerro	15 300	135	33	11
H4 en timo de becerro	11 300	102	27	7



◀Figura 19.22
Micrografía electrónica de cromatina extendida que muestra la organización de "cuentas en collar."

H1, la secuencia de aminoácidos en cada tipo de histona se conserva mucho en todos los eucariotas. Como ejemplo extremo, la histona H4 de bovino difiere de la histona H4 de guisante sólo en dos residuos entre 102. Esa similitud de estructura primaria implica una correspondiente conservación de estructura terciaria y de funciones.

La cromatina se desdobla al tratarla con una solución de poca fuerza iónica (<5 mM). La fibra extendida de cromatina se ve como cuentas en un collar en una micrografía electrónica (figura 19.22). Las "cuentas" son complejos de ADN-histonas llamados **nucleosomas,** y el "collar" es el ADN de doble cadena.

Cada nucleosoma está formado por una molécula de histona H1, dos moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4, y unos 200 pb de ADN (figura 19.23, página siguiente). Las moléculas de H2A, H2B, H3 y H4 forman un complejo proteínico, llamado octámero de histonas, en torno al cual se enrolla el ADN. Unos 146 pb de ADN están en contacto estrecho con el octámero de las histonas y forman una partícula central. El ADN entre las partículas se llama ADN de enlace; tiene unos 54 pb de longitud. La histona H1 se puede unir al ADN de enlace y a la partícula central, pero en la conformación extendida de "cuentas de collar" con frecuencia la H1 está ausente. La histona H1 se encarga de formar estructuras de cromatina de orden superior.

RECUADRO 19.1 Acetilación y desacetilación de histonas

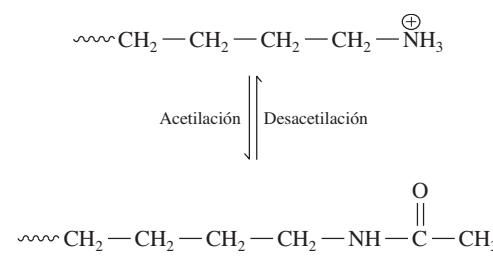
N-terminales de las cuatro histonas centrales son ricos en residuos de lisina (K) y arginina (R) con carga positiva. Estos extremos salen hacia afuera desde la partícula central, donde interactúan con ADN y regiones con carga negativa de otras proteínas. Esas interacciones sirven para estabilizar estructuras de cromatina de orden superior, como la fibra de 30 nm.

En esos extremos N-terminales se pueden acetilar residuos específicos de lisina por enzimas llamadas histona acetiltransferasas (HATS). Por ejemplo, los residuos 5, 8, 12, 16 y 20 en la histona H4 se pueden modificar por acetilación (véanse las imágenes abajo). Con la acetilación disminuye la carga positiva neta de los N-terminales de histona y se debilitan las interacciones con otros nucleosomas y proteínas. El resultado neto es un aflojamiento de estructuras de orden superior.

La acetilación se relaciona con la expresión génica. Las HATS se dirigen de preferencia a sitios donde se debe descubrir la cromatina para transcribir un gen. La relación entre la activación transcripcional y la acetilación de histona se investiga en muchos laboratorios en forma activa.

Las histona desacetilasas son responsables de eliminar grupos acetilo de residuos de lisina. Con eso se restauran las cadenas laterales con carga positiva, y se permite que los nucleosomas adopten la estructura de cromatina más compacta, característica de regiones que no están expresadas.

▲ Secuencia de aminoácidos en el N-terminal de la histona H4.



▲ Acetilación y desacetilación de cadenas laterales de lisina.

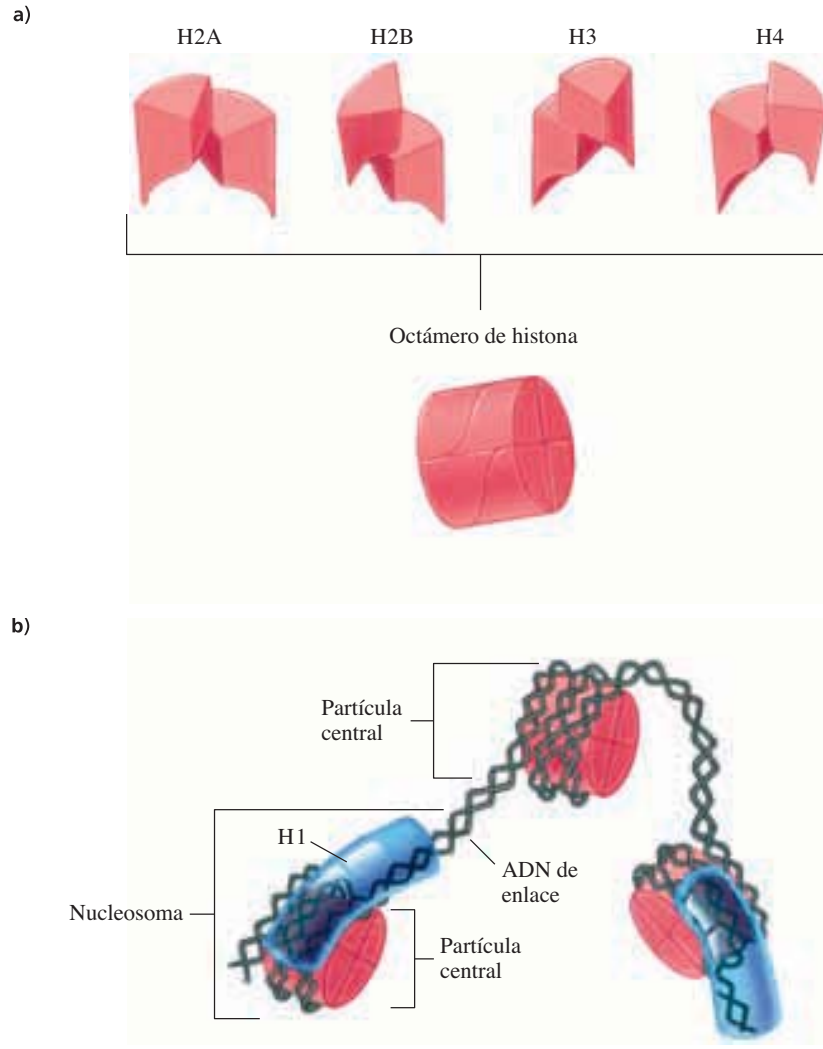


Figura 19.23 ▶
Diagrama de la estructura del nucleosoma. **a)** Octámero de las histonas. **b)** Nucleosomas. Cada nucleosoma está formado por una partícula central más histona H1 y ADN de enlace. La partícula central del nucleosoma está formada por un octámero de histona y aproximadamente 146 pares de bases. La histona H1 une a la partícula central y al ADN de enlace. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

La estructura de la partícula central del nucleosoma se ha determinado por cristalografía con rayos X (figura 19.24). Las ocho subunidades de histona están dispuestas simétricamente como cuatro dímeros: dos dímeros de H2A/H2B y dos dímeros de

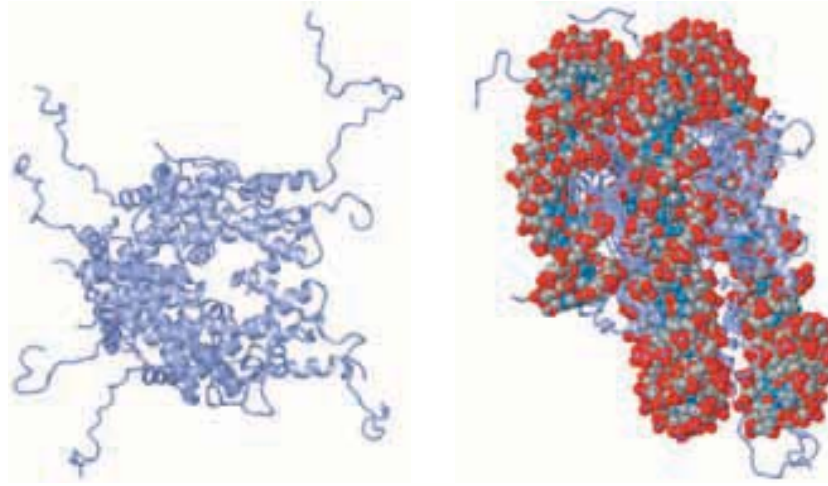


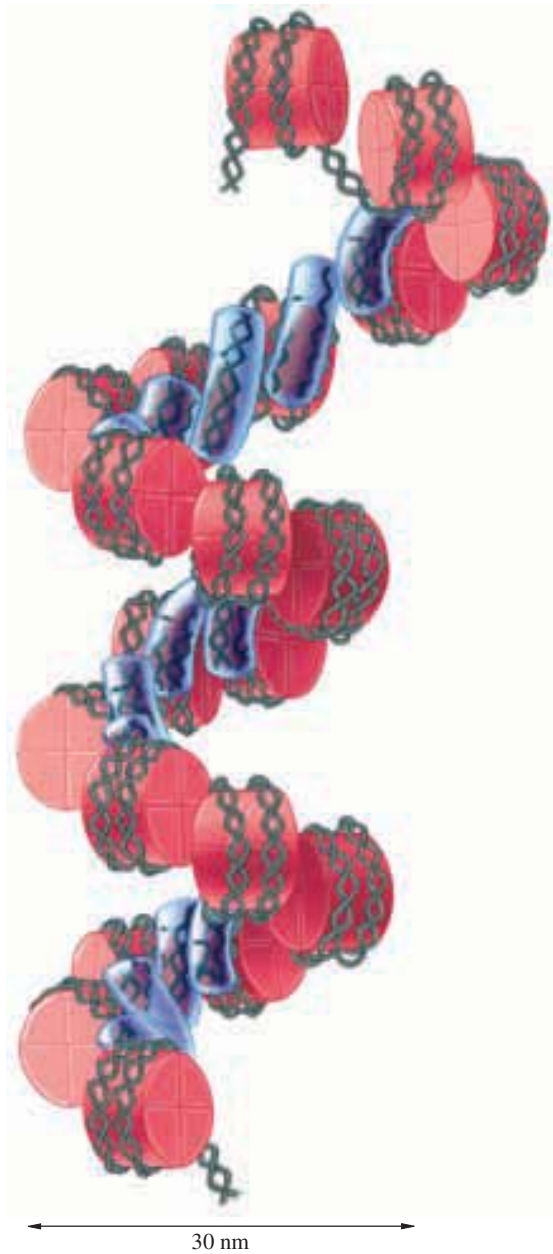
Figura 19.24 ▶
Estructura de la partícula central del nucleosoma del pollo (*Gallus gallus*). **a)** Octámero de histona. **b)** Octámero de histona unido a ADN: vista lateral que muestra la forma discoidal de la partícula. [PDB 1EQZ]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

H3/H4. La partícula tiene la forma de un disco plano con ranuras con carga positiva que acomodan al esqueleto de azúcar-fosfatos del ADN.

El ADN se enrolla en torno a la partícula central y forma aproximadamente $1^3/_4$ de vuelta por nucleosoma. Si ese ADN tuviera conformación extendida, tendría unos 50 nm de longitud, pero cuando se enrolla en la partícula nucleosómica central, la longitud total se reduce al ancho del disco (unos 5 nm). Los enrrollamientos de ADN equivalen topológicamente a superenrollamientos negativos, y son la causa de que el ADN eucariótico se superenrolle cuando se eliminan las histonas de la cromatina.

B. Niveles superiores de estructura de la cromatina

El empaquetamiento de ADN en nucleosomas reduce aproximadamente a la décima parte la longitud de la molécula de ADN. Hay más reducción debida a mayores niveles



◀Figura 19.25
Modelo de la fibra de cromatina de 30 nm. En este modelo se ve la fibra como solenoide o hélice, formada por nucleosomas individuales. Los nucleosomas se asocian por contactos entre moléculas adyacentes de histona H1. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

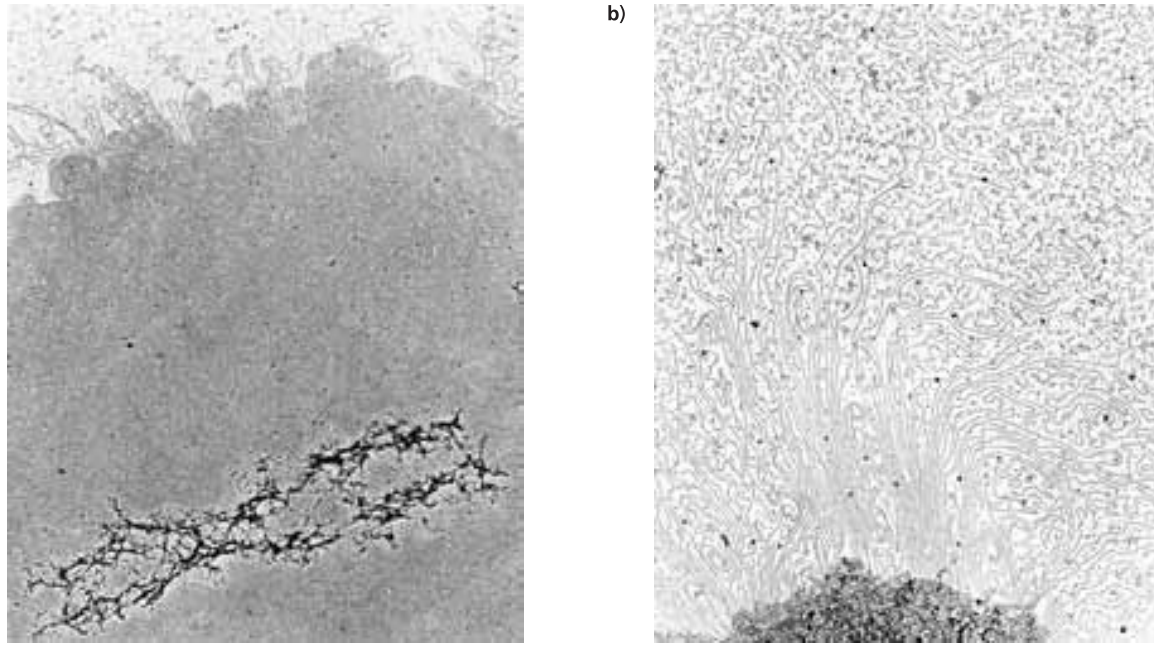


Figura 19.26 ▲
Micrografías electrónicas de un cromosoma sin histonas. **a)** En esta vista se ve todo el andamiaje de proteína. **b)** En este aumento de una parte de a), se pueden ver los bucles individuales unidos al andamiaje de proteína.

de empacamiento del ADN. Por ejemplo, la estructura misma de cuentas en collar se enrolla y forma un solenoide, para llegar a la fibra de 30 nm. En la figura 19.25 se muestra un posible modelo del solenoide. La fibra de 30 nm se forma cuando cada nucleosoma contiene una molécula de histona H1, y las moléculas adyacentes de H1 se unen entre sí, en forma cooperativa, acercando a los nucleosomas para crear una forma de cromatina más compacta y estable. La condensación de la estructura de "cuentas en collar" para formar un solenoide alcanza una reducción adicional a la cuarta parte de la longitud del cromosoma.

Por último, las fibras mismas de 30 nm se unen a un andamio de ARN-proteína que lleva a las fibras formando grandes bucles. Puede haber hasta 2 000 de esos bucles en un cromosoma grande. El andamiaje de ARN-proteína en un cromosoma se puede ver con microscopio electrónico cuando se eliminan las histonas (figura 19.26). La unión de los bucles de ADN al andamio consigue una condensación adicional de 200 veces en la longitud del ADN.

Los bucles de ADN se unen al andamio en su base. Como los extremos no tienen libertad de rotación, los bucles pueden estar superenrollados. (Algunos de los superenrollamientos pueden verse en la figura 19.26b, pero la mayor parte del ADN está relajado, porque se rompe una de las hebras durante el tratamiento para eliminar a las histonas).

C. Empacamiento del ADN bacteriano

Histonas sólo se encuentran en los eucariotas, pero también el ADN procariótico está empacado con proteínas en forma condensada. Algunas de esas proteínas se llaman proteínas similares a histonas, porque se parecen a las histonas eucarióticas. En la mayor parte de los casos no hay partículas definidas semejantes a nucleosomas en los procariotas, y gran parte del ADN no se relaciona con proteínas. El ADN bacteriano está fijo en un andamio, formando grandes bucles de unos 100 kb. Con este arreglo se convierte el cromosoma bacteriano en una estructura llamada nucleoide.

19.6 Nucleasas e hidrólisis de ácidos nucleicos

Las enzimas que catalizan la hidrólisis de los fosfodiésteres en los ácidos nucleicos tienen el nombre colectivo de **nucleasas.** Hay diversas nucleasas en todas las células. Algunas se requieren para la síntesis o reparación del ADN, como se verá en el capítulo 20, en tanto que otras se necesitan en la producción o degradación del ARN celular (capítulo 21).

Algunas nucleasas actúan sobre las moléculas tanto de ARN como de ADN, pero muchas sólo actúan sobre ARN, y otras sólo sobre ADN. Las nucleasas específicas se llaman ribonucleasas (ARNasas) y desoxirribonucleasas (ADNasas). Las nucleasas se pueden clasificar como exonucleasas o endonucleasas. Las **exonucleasas** catalizan la hidrólisis de enlaces fosfodiéster para liberar residuos de nucleótido sólo de un extremo de una cadena de polinucleótidos. Las exonucleasas más comunes son las 3′ → 5′, pero hay algunas exonucleasas 5′ → 3′. Las **endonucleasas** catalizan la hidrólisis de enlaces fosfodiéster en distintos sitios en el interior de una cadena de polinucleótidos. Las nucleasas tienen una gran variedad de especificidades hacia secuencias de polinucleótidos.

Las nucleasas pueden romper el enlace éster 3′ o 5′ de un enlace 3′,5′-fosfodiéster. Un tipo de hidrólisis produce un 5′-monofosfato y un grupo 3′-hidroxilo; el otro tipo produce un 3′-monofosfato y un grupo 5′-hidroxilo (véase la figura 19.27). Una nucleasa dada puede catalizar una reacción o la otra, pero no ambas.

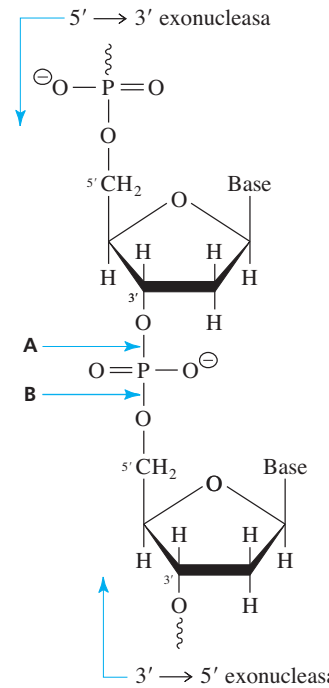


Figura 19.27 ▲
Sitios de ruptura de nucleasa. Las exonucleasas actúan sobre un extremo libre de un polinucleótido y rompen el siguiente enlace fosfodiéster. Las endonucleasas rompen los enlaces fosfodiéster internos. La escisión en el enlace A genera un extremo 5′-fosfato y uno 3′-hidroxilo. La ruptura en el enlace B genera un extremo 3′-fosfato y uno 5′-hidroxilo. Tanto el ADN (que se muestra) como el ARN son sustratos de nucleasas.

A. Hidrólisis alcalina del ARN

La diferencia entre la ribosa del ARN y la 2′-desoxirribosa en el ADN puede parecer pequeña, pero afecta en gran medida las propiedades de los ácidos nucleicos. El grupo 2′-hidroxilo de la ribosa puede formar puentes de hidrógeno en algunas moléculas de ARN, y participa en ciertas reacciones químicas y catalizadas por enzimas.

El efecto de las soluciones alcalinas sobre el ARN y el ADN ilustra las diferencias de reactividad química debidas a la presencia o ausencia del grupo 2′-hidroxilo. El ARN tratado con NaOH 0.1 M a temperatura ambiente se degrada a una mezcla de 2′- y 3′-nucleósido monofosfatos en pocas horas, en tanto que el ADN es estable bajo las mismas condiciones. La hidrólisis alcalina del ARN (figura 19.28, página siguiente) requiere un grupo 2′-hidroxilo. En el primero y segundo pasos, los iones hidróxido sólo actúan como catalizadores, ya que al eliminar un protón del agua (para formar el grupo 5′-hidroxilo en el primer paso, o el grupo 2′- o 3′-hidroxilo en el segundo) se regenera un ion hidróxido por cada ion hidróxido consumido. Nótese que se forma un nucleósido monofosfato 2′,3′-cíclico intermedio. Al romperse cada enlace fosfodiéster, la cadena de polirribonucleótidos se despolimeriza rápidamente. El ADN no se hidroliza en condiciones alcalinas, porque carece del grupo 2′-hidroxilo necesario para iniciar la transesterificación intramolecular. Es probable que la mayor estabilidad química del ADN sea un factor importante en su papel como material genético primario.

B. Hidrólisis de ARN catalizada por ribonucleasa

La ribonucleasa pancreática bovina A (RNasa A) consiste en una sola cadena de polipéptido, de 124 residuos de aminoácidos con enlaces cruzados por cuatro puentes de disulfuro. (Es la misma enzima que se vio en el capítulo 4, en la sección de formación de puentes disulfuro y plegamiento de proteínas). La enzima tiene un pH óptimo aproximado de 6. La RNasa A cataliza la ruptura de enlaces de fosfodiéster en moléculas de ARN en los enlaces 5′-éster. En cadenas representadas en la dirección 5′ → 3′, la escisión sucede a la derecha de los residuos de nucleótido de pirimidina. Entonces, la hidrólisis de una hebra con la secuencia pApGpUpApCpGpU, catalizada por RNasa A, produce pApGpUp + ApCp + GpU.

La RNasa A contiene tres residuos iónicos de aminoácido en el sitio activo Lys-41, His-12 y His-119. Muchos estudios han conducido a la formulación del mecanismo de catálisis que se ve en la figura 19.29 de la página 607. La RNasa A usa tres mecanismos catalíticos fundamentales: proximidad (en la unión y la colocación de un fosfodiéster adecuado entre los dos residuos de histidina); catálisis ácido-base (por

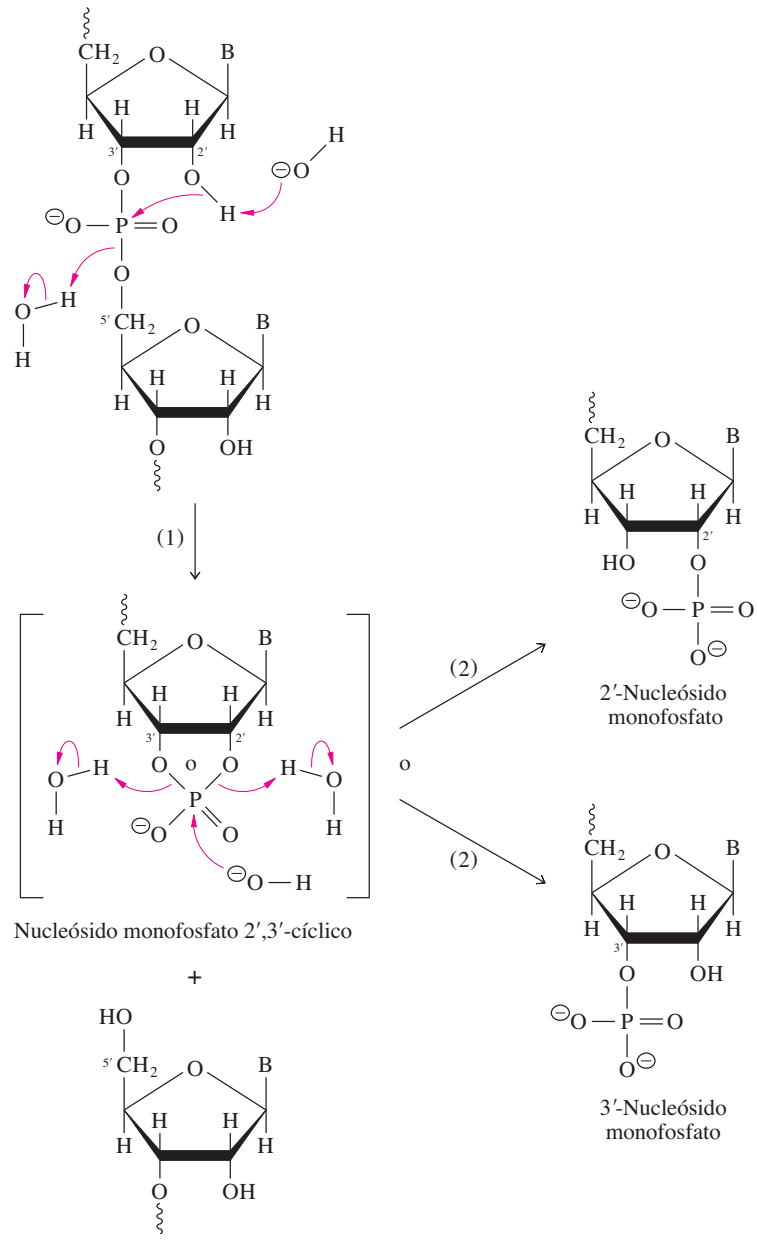


Figura 19.28 ▶
Hidrólisis alcalina de ARN. En el paso 1, un ion hidróxido saca al protón del grupo 2′-hidroxilo en un residuo de nucleótido. El 2′-alcóxido que resulta es un nucleófilo que ataca al átomo de fósforo adyacente, desplazando al átomo de oxígeno en 5′ y generando un nucleósido monofosfato 2′,3′-cíclico. Sin embargo, el compuesto intermedio cíclico no es estable en solución alcalina y un segundo ion hidróxido cataliza su conversión, ya sea a un 2′ o 3′-nucleósido monofosfato (paso 2). B representa una base de purina o pirimidina.

His-119 y His-12), y estabilización del estado de transición (por Lys-41). Como en la hidrólisis alcalina del ARN, la hidrólisis catalizada por RNasa A produce un grupo saliente con un grupo 5′-hidroxilo y un producto nucleósido monofosfato. La hendidura de unión con pirimidina de la enzima explica la especificidad de la RNasa A (en forma muy parecida a como la hendidura de unión de arginina y lisina en la tripsina son las causantes de la especificidad de esa endopeptidasa; sección 6.8B). En los mecanismos de RNasa A y de las serina proteasas, el agua entra al sitio activo al separarse el primer producto (P_1). En la reacción catalizada por RNasa A, el átomo de fósforo en el fosfato del estado de transición es pentacovalente.

La hidrólisis alcalina y la reacción catalizada por RNasa A difieren en dos formas importantes. La primera es que la hidrólisis alcalina puede ocurrir en cualquier residuo, en tanto que la ruptura catalizada por enzima sólo sucede en los residuos de nucleótidos de pirimidina. En segundo lugar, la hidrólisis del compuesto intermedio cíclico es aleatoria en la hidrólisis alcalina (y se producen mezclas de 2′- y 3′-nucleótidos), pero es específica para la ruptura catalizada por RNasa A (y sólo se producen 3′-nucleótidos).

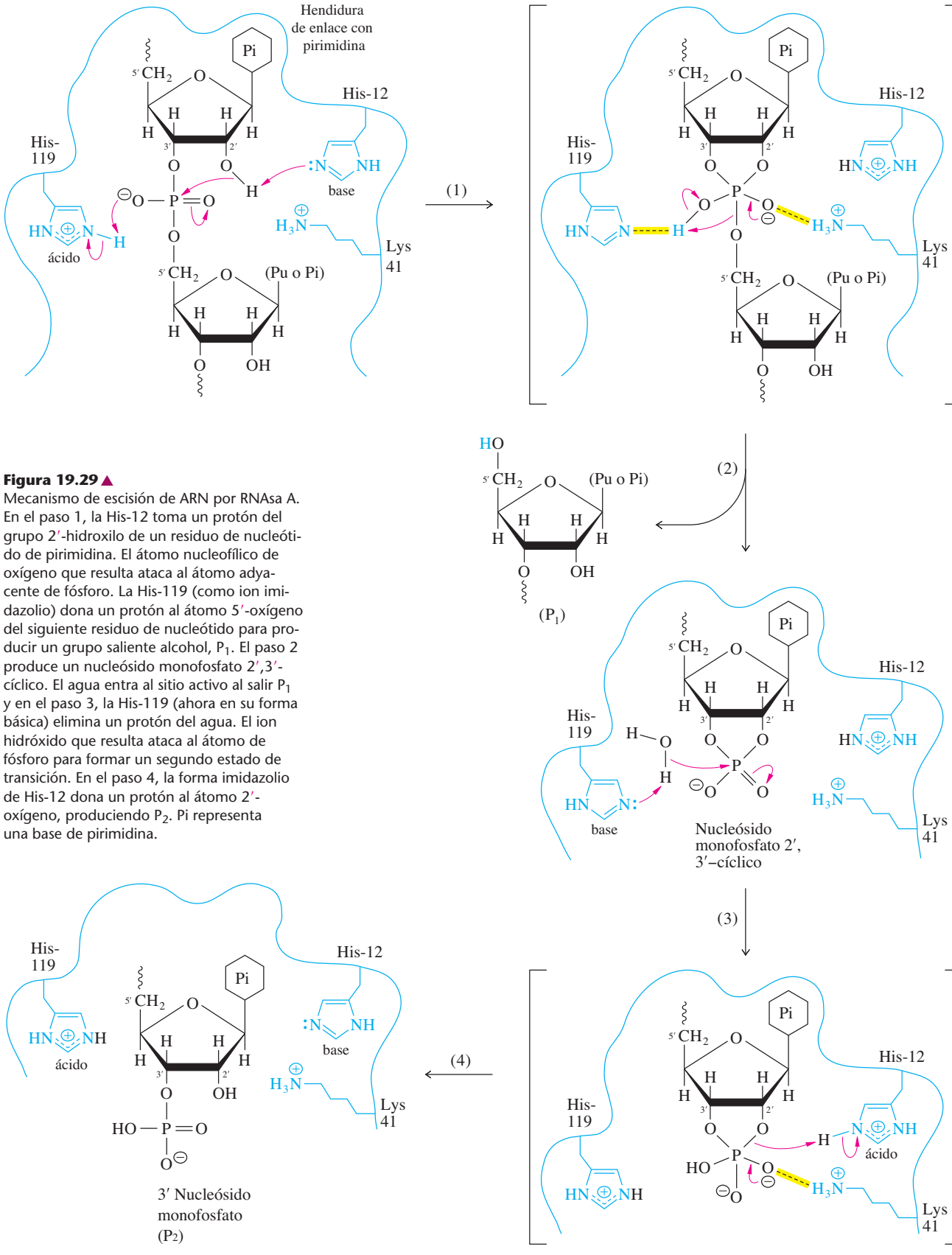


Figura 19.29 ▲
Mecanismo de escisión de ARN por RNAsa A. En el paso 1, la His-12 toma un protón del grupo 2′-hidroxilo de un residuo de nucleótido de pirimidina. El átomo nucleofílico de oxígeno que resulta ataca al átomo adyacente de fósforo. La His-119 (como ion imidazolio) dona un protón al átomo 5′-oxígeno del siguiente residuo de nucleótido para producir un grupo saliente alcohol, P_1. El paso 2 produce un nucleósido monofosfato 2′,3′-cíclico. El agua entra al sitio activo al salir P_1 y en el paso 3, la His-119 (ahora en su forma básica) elimina un protón del agua. El ion hidróxido que resulta ataca al átomo de fósforo para formar un segundo estado de transición. En el paso 4, la forma imidazolio de His-12 dona un protón al átomo 2′-oxígeno, produciendo P_2. Pi representa una base de pirimidina.

C. Endonucleasas de restricción

Las endonucleasas de restricción son una subclase importante de endonucleasas que actúan sobre el ADN. El término *endonucleasa de restricción* se deriva de la observación que ciertas bacterias pueden bloquear infecciones de bacteriófagos (virus) destruyendo en forma específica al ADN del bacteriófago. Esas bacterias *restringen* la expresión de ADN extraño.

Muchas especies de bacterias sintetizan las endonucleasas de restricción que se unen a ADN extraño y lo rompen. Esas endonucleasas reconocen secuencias específicas en el ADN, y cortan ambas hebras del ADN en el sitio de unión, produciendo fragmentos grandes que degradan rápidamente las exonucleasas. El ADN del bacteriófago se rompe y se degrada antes de que se puedan expresar los genes.

La célula huésped debe proteger su propio ADN de la escisión por las endonucleasas de restricción. Eso se hace por modificación covalente de las bases que forman el sitio potencial de unión de endonucleasa. La modificación covalente más común es la metilación específica de residuos de adenina o citosina dentro de la secuencia de reconocimiento. La presencia de bases metiladas en el sitio potencial de unión inhibe la ruptura del ADN huésped por la endonucleasa de restricción. La metilación es catalizada por una metilasa específica que se une a la misma secuencia de ADN, reconocida por la endonucleasa de restricción. Así, las células que contienen una endonucleasa de restricción también contienen una metilasa con igual especificidad.

Por lo regular, todo el ADN de la célula huésped se metila en forma específica, y en consecuencia se protege contra la ruptura. Un ADN no metilado que entra a la célula es escindido por las endonucleasas de restricción. Después de la replicación del ADN, cada sitio en el ADN huésped se hemimetila, esto es, se metilan las bases sólo en una hebra. Los sitios hemimetilados son sustratos de gran afinidad para la metilasa, pero no son reconocidos por la endonucleasa de restricción. Por consiguiente, los sitios hemimetilados se convierten rápidamente o en sitios totalmente metilados del ADN huésped.

La mayor parte de las endonucleasas de restricción (también se llaman enzimas de restricción) se pueden clasificar en tipo I o tipo II. Las endonucleasas de restricción tipo I catalizan tanto la metilación del ADN huésped como la ruptura de ADN no metilado en una secuencia específica de reconocimiento. Las endonucleasas de restricción del tipo II son más simples, porque sólo pueden romper ADN de doble hebra con una secuencia de reconocimiento no metilada o cerca de ésta; no poseen una actividad de metilasa. Metilasas de restricción diferentes catalizan la metilación del ADN huésped en las mismas secuencias de reconocimiento. El origen del grupo metilo en esas reacciones es S-adenosilmetionina.

Se han caracterizado más de 200 endonucleasas de restricción deL tipo I y tipo II. En la tabla 19.4 se presentan las especificidades de algunas enzimas representativas. Casi en todos los casos, los sitios de reconocimiento tienen un eje de simetría doble; esto es, la secuencia $5' \rightarrow 3'$ de residuos es igual en ambas hebras de la molécula de ADN. De esta forma, las secuencias apareadas se "leen" igual en cualquier dirección. Esas secuencias se llaman palindromos. (Entre los palindromos están ANA, RADAR o incluso DÁBALE ARROZ A LA ZORRA EL ABAD, sin tener en cuenta puntuación, espacios ni acentos).

La *Eco*RI fue una de las primeras endonucleasas de restricción que se descubrieron. Existe en muchas cepas de *E. coli*. Como se ve en la tabla 19.4, la *Eco*RI tiene una secuencia palindrómica de reconocimiento de seis pares de bases (la secuencia $5' \rightarrow 3'$ es GAATTC en cada hebra). La *Eco*RI es un homodímero y, como su sustrato, posee un eje doble de simetría. En *E. coli*, la metilasa compañera de EcoRI convierte la segunda adenina en la secuencia de reconocimiento en N6-metiladenina (figura 19.30). Toda molécula de ADN de doble hebra que tenga una secuencia GAATTC no metilada es un sustrato para *Eco*RI. La endonucleasa cataliza la hidrólisis de los fosfodiésteres que unen a G con A en cada hebra, por lo que escinden al ADN.

Algunas endonucleasas de restricción (incluyendo *Eco*RI, *Bam*HI, e *Hin*dIII) catalizan la escisión alternada y producen fragmentos de ADN con extensiones de una

TABLA 19.4 Especificidades de algunas endonucleasas de restricción comunes

Procedencia	Enzima[a]	Secuencia de reconocimiento[b]
Acetobacter pasteurianus	*Apa*I	GGGCC↓C
Bacillus amyloliquefaciens H	*Bam*HI	G↓GATCC
Escherichia coli RY13	*Eco*RI	G↓AA*TTC
Escherichia coli R245	*Eco*RII	↓CC*TGG
Haemophilus aegyptius	*Hae*III	GG↓CC
Haemophilus influenzae R_d	*Hin*dIII	A*↓AGCTT
Haemophilus parainfluenzae	*Hpa*II	C↓CGG
Klebsiella pneumoniae	*Kpn*I	GGTAC↓C
Nocardia otitidis-caviarum	*Not*I	GC↓GGCCGC
Providencia stuartii 164	*Pst*I	CTGCA↓G
Serratia marcescens S_b	*Sma*I	CCC↓GGG
Xanthomonas badrii	*Xba*I	T↓CTAGA
Xanthomonas holcicola	*Xho*I	C↓TCGAG

[a] Los nombres de las endonucleasas de restricción son abreviaturas de los nombres de los organismos que las producen. En algunos nombres abreviados sigue una letra que indica la cepa. Los números romanos indican el orden de descubrimiento de la enzima en esa cepa.

[b] Las secuencias de reconocimiento se escriben de 5′ a 3′. Sólo se representa una cadena. Las flechas indican los sitios de ruptura. Los asteriscos representan posiciones conocidas donde se pueden metilar las bases.

sola hebra (tabla 19.4 y figura 19.30). Estas regiones de una hebra se llaman extremos pegajosos, porque son complementarios y entonces pueden volver a formar una estructura de doble hebra. Otras enzimas, como *Hae*III y *Sma*I, producen extremos romos sin extensiones de una sola hebra.

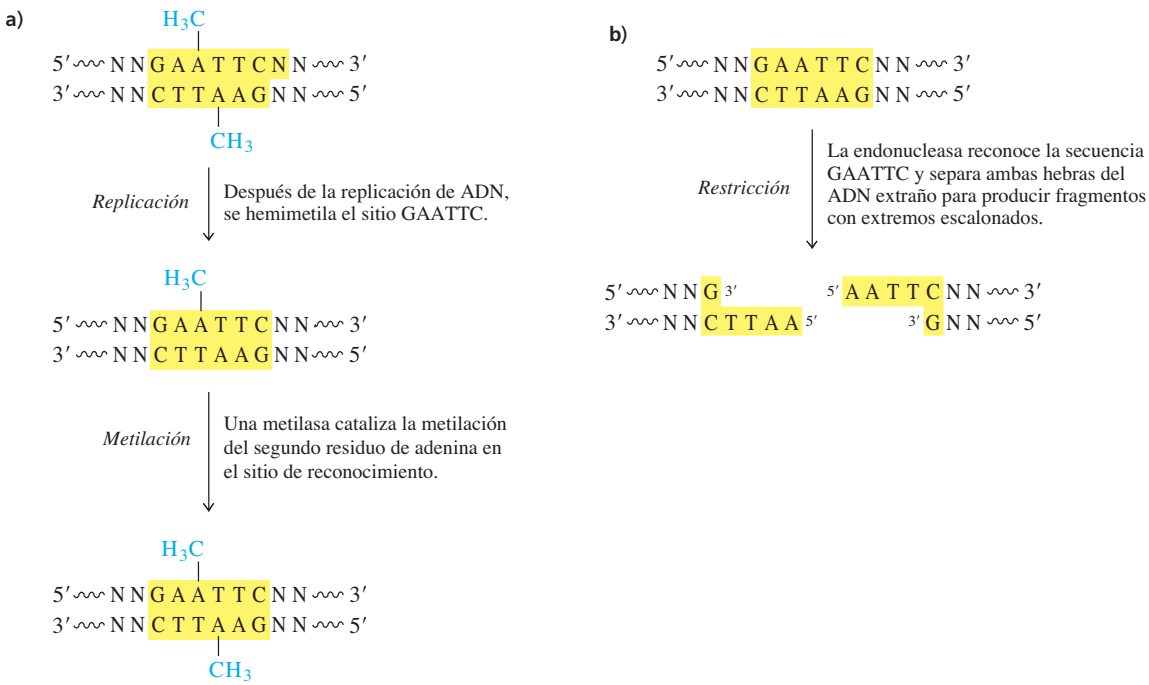


Figura 19.30 ▲
Metilación y restricción en el sitio *Eco*RI. **a)** Metilación de residuos de adenina en el sitio de reconocimiento. **b)** Escisión de ADN no metilado para producir terminaciones pegajosas.

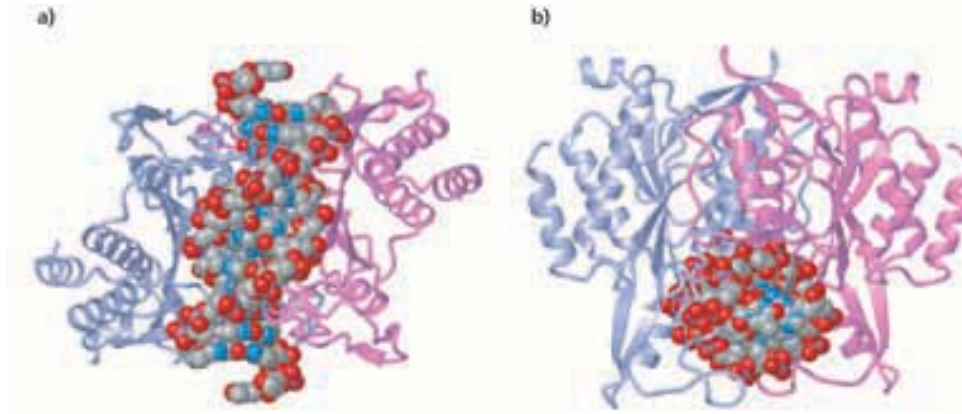


Figura 19.31 ▲
*Eco*RI unida a ADN. La *Eco*RI está formada por dos subunidades idénticas (púrpura y azul). La enzima está unida a un fragmento de ADN con la secuencia CGCGAATTCGCG (subrayar la secuencia de reconocimiento). **a)** Vista lateral. **b)** Vista superior. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

D. Unión firme de *Eco*RI a ADN

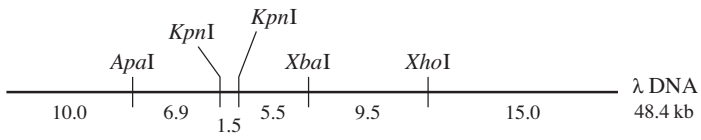
Las endonucleasas de restricción se deben enlazar fuertemente al ADN para reconocer determinada secuencia y romper en determinado sitio. La estructura de EcoRI unida al ADN se ha determinado por cristalografía con rayos X. Como se ve en la figura 19.31, cada mitad del homodímero de EcoRI se une a un lado de la molécula de ADN, para que esa molécula quede casi rodeada. La enzima reconoce la secuencia específica de nucleótidos, poniéndose en contacto con pares de bases en la hendidura mayor. La hendidura menor (a la mitad de la estructura que se ve en la figura 19.31) queda expuesta al ambiente acuoso.

Algunos residuos de aminoácido recubren la hendidura que forman los dos monómeros de EcoRI. Las cadenas laterales de esos residuos interactúan electrostáticamente con los esqueletos de azúcar-fosfato del ADN. Además, dos residuos de arginina (Arg-145 y Arg-200), y un residuo de glutamato (Glu-144) en cada monómero de EcoRI forman puentes de hidrógeno con pares de bases en la secuencia de reconocimiento, asegurando así el enlazamiento. Otras interacciones no específicas con los esqueletos estabilizan más al complejo.

La *Eco*RI es típica de proteínas que reconocen y se unen a secuencias *específicas* del ADN. El ADN conserva su conformación B, aunque en algunos casos queda un poco doblada la hélice. El reconocimiento de determinada secuencia de nucleótidos depende de las interacciones entre la proteína y los grupos funcionales en las bases que están expuestas en las hendiduras. En contraste, las histonas son ejemplos de proteínas que se unen en forma *no específica* a los ácidos nucleicos. El enlazamiento de esas proteínas depende mucho de las interacciones débiles entre la proteína y los esqueletos de azúcar-fosfato, y no del contacto directo con las bases.

19.7 Usos de las endonucleasas de restricción

Las endonucleasas de restricción se descubrieron hace más de 35 años. Las primeras enzimas purificadas se convirtieron pronto en medios importantes para manipular ADN en el laboratorio. Uno de los primeros usos fue para desarrollar mapas de restricción de ADN; esto es, diagramas de moléculas de ADN que muestran sitios específicos de escisión. Esos mapas son útiles para identificar fragmentos de ADN que contienen genes específicos. El descubrimiento de las endonucleasas de restricción pronto permitió la



◀Figura 19.32
Mapa de restricción del bacteriófago λ, mostrando los sitios de escisión para algunas enzimas de restricción. Por ejemplo, hay un solo sitio para la enzima *Apa*I, La digestión del ADN del fago λ con esta enzima produce dos fragmentos de 10.0 y 38.4 kb, como se ve en la primera banda de la figura 19.33.

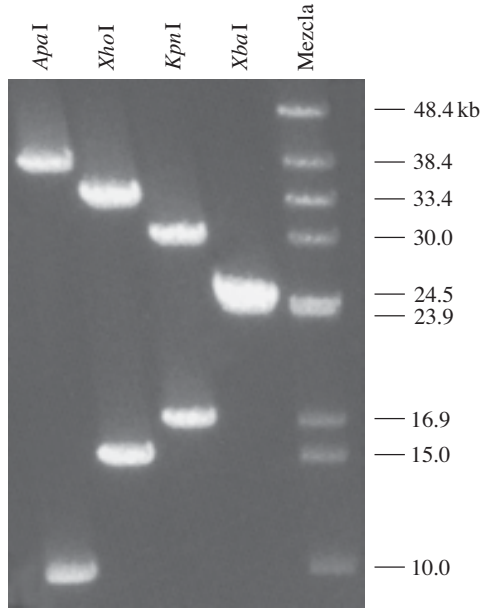
creación de moléculas de ADN recombinante, uniendo o recombinando, fragmentos diferentes de ADN producidos por las enzimas.

En la figura 19.32 se ve un ejemplo de un mapa de restricción para ADN de bacteriófago. El ADN de bacteriófago es una molécula lineal, de doble hebra con unos 48 400 pares de bases, o 48.4 kb, de longitud. Si este ADN se trata con varias enzimas de restricción y se miden los tamaños de los fragmentos que resultan, es posible formar un mapa de los sitios de ruptura. En la figura 19.33 se ve un ejemplo de esas digestiones de restricción. En un experimento real de caracterización de restricciones se combina la información de muchas digestiones de restricción para producir un mapa completo y exacto.

En el capítulo 23 se describirá el uso de las enzimas de restricción para crear moléculas de ADN recombinante.

La tecnología necesaria para construir mapas de restricción de sitios de ruptura de endonucleasa fue desarrollada en la década de 1970. Pronto se vio que se podía usar el procedimiento para identificar los sitios de mutaciones o variaciones, en el genoma de una población. Por ejemplo, distintas cepas de bacteriófago λ tienen mapas de restricción un poco diferentes, porque sus secuencias de ADN no son idénticas. Una cepa puede tener la secuencia GGGCCC cerca del extremo izquierdo de su ADN, y la *Apa*I, la rompe y produce los dos fragmentos que se ven en la figura 19.33. Otra cepa puede tener la secuencia GGACCC en el mismo sitio. Como esa secuencia no es sitio de ruptura para *Apa*I, el mapa de restricción de esta cepa es distinto del que muestra la figura 19.32.

Con las variaciones en la secuencia de ADN se pueden identificar individuos en una gran población heterogénea. Por ejemplo, en los humanos, las regiones del genoma que son muy variables producen fragmentos de restricción que son tan exclusivos como las huellas dactilares. Esas dactiloscopias de ADN se pueden usar en juicios de paternidad, o en investigaciones de delitos, para identificar o exonerar a sospechosos.



◀Figura 19.33
Digestión del ADN del bacteriófago λ por cuatro endonucleasas de restricción. Una solución de ADN se trata con una enzima y se electroforiza en gel de agarosa, con lo que se separan fragmentos de acuerdo con su tamaño. Los fragmentos más pequeños se mueven con más rapidez y se encuentran en la parte inferior del gel. (En esta figura no se ve un fragmento de 1.5 kb.) La enzima de restricción para cada digerido se indica en la parte superior de la banda. La banda de la derecha contiene ADN intacto del fago λ, y una mezcla de fragmentos de los cuatro digeridos. En el digerido *Xba*I no están bien separados dos fragmentos de 23.9 y 24.5 kb.

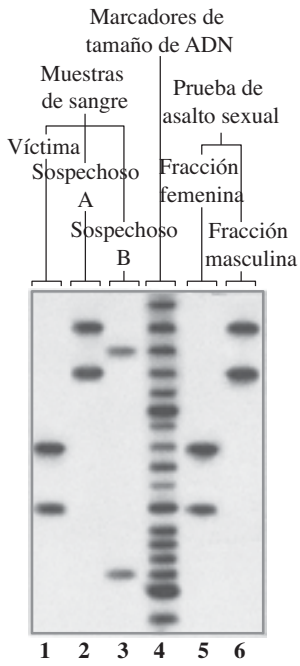


Figura 19.34 ▲
Dactiloscopia de ADN.

En la figura 19.34 se ve un ejemplo de dactiloscopia en un caso de violación. Los ADN tomados de la víctima, de la evidencia (semen) y de dos sospechosos se digieren con una endonucleasa de restricción. Los fragmentos se separan en gel de agarosa, como se describió en la figura 19.33. Este ADN se transfiere (se absorbe) entonces a una membrana de nailon. El ADN enlazado se desnaturaliza y se expone a pequeños fragmentos de ADN marcado con radioisótopos procedente de una región variable del genoma humano. El patrón de ADN marcado se hibrida en forma específica con los fragmentos de restricción en la membrana de nailon derivados de esa región. Los fragmentos marcados se identifican por autorradiografía.

Con la técnica se identificó que el sospechoso A fue el violador. En las investigaciones penales reales se usan varios patrones diferentes, en combinación con distintas digestiones de restricción, para asegurar que la pauta detectada sea única. Las técnicas modernas tienen el suficiente poder y exactitud para excluir en forma concluyente a algunos sospechosos y consignar a otros. Cuando se combinan con la amplificación de ADN por la reacción en cadena de polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*) (capítulo 22), se puede obtener una dactiloscopia de un folículo piloso o de una pequeña mancha de sangre.

Resumen

1. Los ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos, que a su vez son ésteres de fosfato de nucleósidos fosfato. Los tautómeros amino y lactama de las bases forman puentes de hidrógeno en los ácidos nucleicos.

2. El ADN contiene dos hebras antiparalelas de residuos de nucleótido, unidos por enlaces 3′-5′-fosfodiéster. A y G en una hebra se aparean con T y C, respectivamente, en la otra hebra.

3. La estructura helicoidal doble del ADN es estabilizada por puentes de hidrógeno, efectos hidrofóbicos, interacciones de apilamiento e interacciones entre cargas. El ADN rico en G/C es más difícil de desnaturalizar que el rico en A/T; entre las conformaciones alternativas están el A-ADN y el Z-ADN.

4. El envolvimiento o desenvolvimiento de la hélice de ADN puede producir superenrollamientos, que restauran la conformación B.

5. Las cuatro clases principales de ARN son ARN ribosómico, ARN de transcripción, ARN mensajero y ARN pequeño. Las moléculas de ARN son de una hebra y tienen una extensa estructura secundaria.

6. Las moléculas de ADN eucariótico están empacadas con histonas, formando nucleosomas. La posterior condensación y fijación al andamiaje de un cromosoma produce una reducción total de 8 000 veces la longitud de la molécula de ADN en los cromosomas en la metafase.

7. Los esqueletos de fosfodiéster de los ácidos nucleicos pueden hidrolizarse por las acciones de las nucleasas. La hidrólisis alcalina y la hidrólisis catalizada por RNasa A, del ARN, se efectúan pasando por un nucleósido monofosfato 2′,3′-cíclico.

8. Las endouncleasas de restricción catalizan la hidrólisis de ADN en secuencias específicas palindrómicas de nucleótidos. Estas enzimas son útiles para elaborar mapas de restricción de ADN.

Problemas

1. Compare los puentes de hidrógeno en la α hélice de proteínas con los de la doble hélice del ADN. En la respuesta, describa el papel de los puentes de hidrógeno para estabilizar esas dos estructuras.

2. Un tramo de ADN de doble cadena contiene 1 000 pares de bases, y su composición de bases es 58% (G + C). ¿Cuántos residuos de timina hay en esta región del ADN?

3. *a*) Las dos hebras complementarias de un segmento de ADN ¿tienen la misma composición de bases?
b) ¿Son iguales (A + G) y (C + T)?

4. Si una hebra de ADN tiene la secuencia

ATCGCGTAACATGGATTCGG

escriba la secuencia de la hebra complementaria, apegándose a la convención normal.

5. Poli-A forma una hélice de una hebra. ¿Qué fuerzas estabilizan esta estructura?

6. El tautómero imino de la adenina se presenta rara vez en el ADN, pero cuando lo hace se puede aparear con citosina en vez de con timina. Ese mal apareamiento puede causar una mutación. Trace el par de bases que se forman entre el tautómero imino de la adenina y la citosina.

7. El poli-dA de una hebra se puede hibridar con poli-dT de una hebra para formar un ADN de doble hebra con bases apareadas, según Watson-Crick. Bajo las condiciones adecuadas, una segunda hebra de poli-dT se puede unir en el surco mayor para formar una triple hélice de ADN, con puentes de hidrógeno entre la timina y el grupo amino N-7 de la adenina. ¿Cuál sería una gráfica de absorbencia a 260 nm en función de la temperatura, para este raro ADN de triple hélice?

8. Escriba la secuencia del ARN de la figura 19.21. ¿Es un palindromo?

9. Imagine un tratamiento con una exonucleasa que se une exclusivamente al ADN de doble hebra, y degrada una hebra en la dirección $5' \rightarrow 3'$. En una reacción donde el sustrato sea un fragmento de ADN lineal con 1 kb, ¿cuáles serán los principales productos después de haber terminado la digestión?

10. La masa molecular relativa de un par de bases en ADN de doble hebra es 650, aproximadamente. Con los datos de la tabla 19.3, calcule la relación entre masas de proteína y ADN en una fibra de 30 nm, típica de cromatina.

11. El genoma haploide humano contiene 3.2 × 109 pares de bases. ¿Cuántos nucleosomas heredó el lector de su madre?

12. Una molécula de ADN tiene la secuencia pdApdGpdTpdC, y puede escindirse con exonucleasas. Escriba los productos de una sola reacción catalizada por las enzimas siguientes:
a) una exonucleasa $3' \rightarrow 5'$ que rompa al enlace 3′ éster de una unión fosfodiéster.
b) una exonucleasa $5' \rightarrow 3'$ que rompa al enlace 5′ éster de una unión fosfodiéster.
c) una exonucleasa $5' \rightarrow 3'$ que rompa al enlace 3′ éster de una unión fosfodiéster.

13. Una endonucleasa no específica para secuencia, procedente de *Aspergillus oryzae* y purificada, digiere ADN de una hebra. Indique qué efecto tendrá agregar esta enzima a una preparación de ADN superenrollado negativamente de ADN plásmido.

14. Una de las proteínas en el veneno de la víbora de cascabel es una enzima llamada fosfodiesterasa. ¿Podrían los polinucleótidos ser un sustrato para esta enzima? ¿Por qué?

15. La RNasa T1 rompe al ARN después de los residuos G, para dejar un grupo 3′-fosfato. Indique qué productos de escisión tendrá este sustrato:

pppApCpUpCpApUpApGpCpUpApUpGpApGpU

16. ¿Cómo podrían escapar los bacteriófagos de las endonucleasas bacterianas de restricción?

17. El nematodo libre *C. elegans* de la tierra, fue el primer metazoario en tener secuenciado todo su genoma de 100 Mb. En general, el genoma del gusano tiene 36% de (G + C) y 64% de (A + T). La endonucleasa de restricción *Hind*III reconoce y corta la secuencia palindrómica hexámera AAGCTT, y genera extremos pegajosos. *a*) Aproximadamente ¿cuántos sitios *Hind*III se podrían encontrar en el genoma de *C. elegans*? *b*) Si en realidad el genoma del gusano tuviera 25% de G y 25% de A, aproximadamente ¿cuántos sitios *Hind*III se espera encontrar?

Lecturas seleccionadas

Perspectiva histórica

Clayton, J. y Denis, C., eds. (Nature/Pallgrave/Macmillan) (2003). *50 años de DNA*

Judson, H. F. (1996). *The Eighth Day of Creation: Makers of the Revolution in Biology*, Expanded ed. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Maddox, B. (2002). *Rosalind Franklin. The Dark Lady of DNA*(Perennial/HarperCollins).

Watson, J. D. y Berry, A. (2003). *DNA: DNA: The Secret of Life* (New York: Alfred A. Knope).

Watson, J.D. (1968). (1968). *The Double Helix* (New York: Atheneum).

Estructura y propiedades de polinucleótidos

Berger, J. M. y Wang, J. C. (1996). Recent developments in DNA topoisomerase II structure and mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6:84-90.

Ferré-D'Amaré, A. R. y Doudna, J. A. (1999). RNA FOLDS: insights from recent crystal structures. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28:57-73.

Herbert, A. y Rich, A. (1996). The biology of left-handed Z-DNA. *J. Biol. Chem.* 271:11595-11598.

Hunter, C. A. (1996). Sequence-dependent DNA structure. *BioEssays* 118:157-162.

Packer, M. J. y Hunter, C. A. (1998). Sequence-dependent DNA structure: the role of the sugar-phosphate backbone. *J. Mol. Biol.* 280:407-420.

Saenger, W. (1984). *Principles of Nucleic Acid Structure* (New York: Springer-Verlag).

Sharma, A. y Mondragón, A. (1995). DNA topoisomerases. *Curr. Biol.* 5:39-47.

Turner, D. H. (1996). Thermodinamics of base pairing. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6:299-304.

Cromatina

Beebe, T. P., Jr., Wilson, T. E., Ogletree, D. F., Katz, J. E., Balhorn, R., Salmeron, M. B. y Siekhaus, W. J. (1989). Direct observation of native DNA structures with the scanning tunneling microscope. *Science* 243:370-372.

Bendlich, A. J. y Drlica, K. (2000). Prokaryotic and eukaryotic chromosome: what's the difference? *BioEssays* 22:481-486.

Burlingame, R. W., Love, W. E., Wang. B.-C., Hamling, R., Xuong, N.-H. y Moudrianakis, E. N. (1985). Crystallographic structure of the octameric histone core of the nucleosome at a resolution of 3.3 Å. *Science* 228:546-553.

Kornberg, R. D. (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryotic chromosome. *Cell.* 98:285-294.

Ramakrishnan, V. (1997). Histone structure and the organization of the nucleosome. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26:83-112.

Richmond, T. J., Finch, J. T., Rushton, D., Rhodes, D. y Klug, A. (1984). Structure of the nucleosome core particle at 7 Å Resolution. *Nature* 311:532-537.

Van Holde, K., y Zlatanova, J. (1999). The nucleosome core particle: does it have structural and functional relevance? *BioEssays* 21:776-780.

Wagner, R. P., Maguire, M. P. y Stallings, R. L. (1993). *Chromosomes* (New York: John Wiley & Sons).

Workman. J. L. y Kingston, R. E. (1998). Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 67:545-579.

Endonucleasas de restricción

Kovall, R. A. y Mathews, B. W. (1999). Type II restriction endonucleases: structural, functional and evolutionary relationships. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3:587-583.

McClarin, J. A., Frederick, C. A., Wang, B. -C., Greene, P., Boyer, H., Grable, J. y Rosenberg, J. M. (1986). Structure of the DNA-*Eco*RI endonuclease recognition complex at 3 Å resolution. *Science* 234:1526-1541.

Ne, M. (2000). Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle). *Microbiol. Mol. Rev.* 64:412-434.

20

capítulo
veinte

Replicación, reparación y recombinación del ADN

La transferencia de la información genética de una generación a la siguiente ha confundido a los biólogos desde los tiempos de Aristóteles. Hoy, 2 500 años después, puede explicarse por qué "lo semejante engendra lo semejante". Ya que la información genética está contenida en el ADN, la consecuencia es que la transferencia de la información de una célula parental (o precursora) a dos células hijas requiere una duplicación exacta del ADN, y ese proceso se llama replicación del ADN. La estructura que propusieron Watson y Crick en 1953 de inmediato sugirió un método de replicación. Como las dos hebras del ADN doble helicoidal son complementarias, la secuencia de nucleótidos de una especifica automáticamente la secuencia de la otra. Watson y Crick propusieron que las dos hebras de la hélice se desenrollan durante la replicación del ADN, y que cada hebra del ADN actúa como plantilla para sintetizar una hebra complementaria. De esta forma, la replicación del ADN produce dos moléculas hijas de doble hebra, y cada una contiene una hebra parental y una hebra recién sintetizada. A este modo de replicación se le llama semiconservativa, porque una hebra del ADN parental se conserva en cada molécula hija (figura 20.1, página siguiente).

En una serie de experimentos, Matthew Meselson y Franklin W. Stahl demostraron, en 1958, que en realidad el ADN se replica en forma semiconservativa, como habían indicado Watson y Crick. Más o menos al mismo tiempo comenzaron a aparecer informes de la purificación y las propiedades de algunas de las enzimas que intervienen en la replicación. La primera ADN polimerasa fue purificada en 1958 por Arthur Kornberg, a quien se le otorgó el Premio Nobel por este logro. En fecha más reciente, los bioquímicos han aislado y caracterizado las enzimas que catalizan todos los pasos en la replicación del ADN, y han identificado a los genes que codifican esas proteínas. El mecanismo de la replicación actual es mucho más complejo, y más interesante, que el sencillo esquema de la figura 20.1.

Para establecer los pasos del mecanismo de replicación se necesitó una combinación de análisis bioquímicos y genéticos. Gran parte de lo que se conoce acerca de la replicación del ADN proviene de estudios de las enzimas en *Escherichia coli*, y de sus bacteriófagos. Los resultados de esos estudios han demostrado cómo se ensamblan

Arriba: Unión Holliday, compuesto intermedio que se forma durante la recombinación de dos moléculas de ADN de doble hebra.

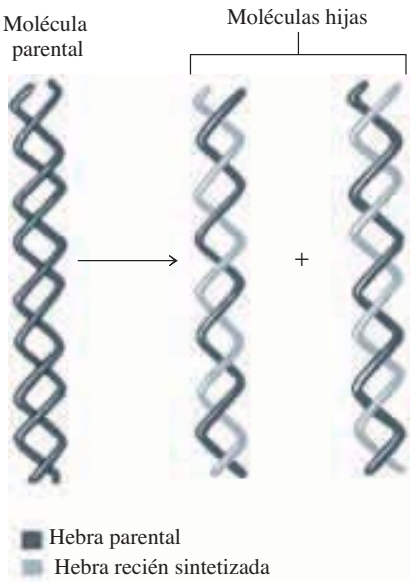


Figura 20.1 ▲
Replicación semiconservativa del ADN. Cada hebra del ADN actúa como plantilla para la síntesis de una hebra nueva. Cada molécula hija de ADN contiene una hebra parental y una hebra recién sintetizada.

grandes cantidades de polipéptidos en complejos que efectúan una serie complicada de reacciones. El complejo de replicación de ADN es como una máquina, o una fábrica, cuyas partes son de proteína. Algunos de los polipéptidos componentes tienen actividad parcial en el aislamiento, pero otros sólo son activos en asociación con la máquina completa de proteínas.

Hay tres etapas distintas en la replicación del ADN: 1) La iniciación comienza con el ensamble correcto de las proteínas de replicación en el sitio donde debe comenzar la replicación de ADN. 2) Durante la etapa de elongación, el ADN se replica en forma semiconservativa cuando el complejo cataliza la incorporación de nucleótidos en las hebras crecientes de ADN. 3) Por último, cuando termina la replicación, se desarma la máquina de proteínas y las moléculas hijas se separan para poderse segregar en sus nuevas células.

Las máquinas de proteínas que efectúan una serie de reacciones bioquímicas no se limitan al proceso de replicación de ADN, sino también están en la transcripción (capítulo 21) y en la traducción (capítulo 22). Estos tres procesos incluyen los pasos de iniciación, elongación y terminación. Además, hay evidencias crecientes de que también otros procesos de metabolismo celular se efectúan mediante complejos de enzimas débilmente asociadas y otras macromoléculas.

El mantenimiento de información genética de una generación a otra requiere que la replicación de ADN sea rápida (porque se debe replicar todo el complemento de ADN antes de cada división celular) y exacta. Además de tener enzimas de polimerización muy exactas, todas las células tienen enzimas que corrigen errores de replicación, y reparan ADN dañado. Además, todas las células pueden combinar trozos de ADN en un proceso llamado recombinación genética. Tanto la reparación como la recombinación también usan muchas de las mismas enzimas y proteínas que se requieren para la replicación del ADN.

La estrategia general de la replicación, reparación y recombinación de ADN en procariotas y eucariotas parece conservarse, aunque varían las enzimas específicas entre los organismos. Así como se parecen dos marcas distintas de automóviles, también los mecanismos de replicación, reparación y recombinación de ADN son parecidos en todos los organismos, aunque pueden diferir las enzimas individuales. Aquí se enfocará la bioquímica de esos tres procesos en *E. coli*, porque tiene muchas enzimas y bien caracterizadas.

20.1 La replicación de ADN en cromosomas es bidireccional

El cromosoma de *E. coli* es una molécula de ADN grande, circular y de doble hebra, de 4.6×10^3 kilopares de bases (kb). La replicación de este cromosoma comienza en un sitio único llamado origen de replicación, y sigue en forma bidireccional hasta que se encuentran los dos complejos de replicación en el sitio de terminación, que es donde se detiene la replicación (figura 20.2). La máquina de proteínas que efectúa la reacción de polimerización se llama replisoma. Contiene varias proteínas diferentes que se requieren para una replicación rápida y fiel del ADN. Un replisoma está en cada una de las dos horquillas de replicación, los puntos donde se destuerce el ADN parental. La figura 20.3 muestra una autorradiografía de un cromosoma de *E. coli* en replicación.

Al desenrollarse el ADN parental en una horquilla de replicación, cada hebra se usa como plantilla de síntesis para una nueva hebra. En *E. coli*, la velocidad de movimiento de una horquilla de replicación es de unos 1 000 pares de bases por segundo. En otras palabras, cada una de las dos nuevas hebras se extiende a la velocidad de 1 000 nucleótidos por segundo. Como hay dos horquillas de replicación que se mueven con esa velocidad, todo el cromosoma de *E. coli* se puede duplicar aproximadamente en 38 minutos.

Los cromosomas eucarióticos son moléculas de ADN lineales y de doble hebra que suelen ser mucho mayores que los cromosomas de las bacterias. Por ejemplo, los grandes cromosomas de la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster,* tienen unos 5×10^4 kb, 10 veces más que el cromosoma de *E. coli*. En los eucariotas, como en *E. coli*, la

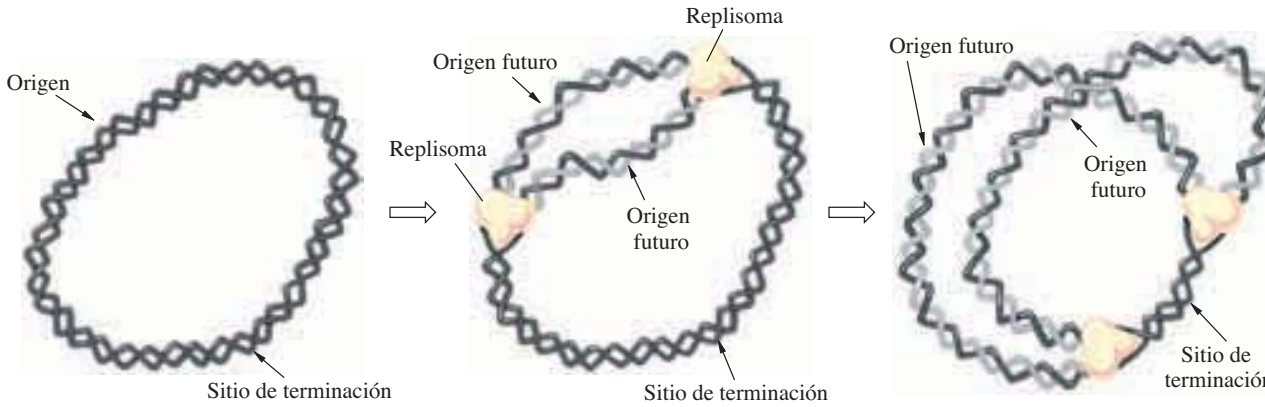
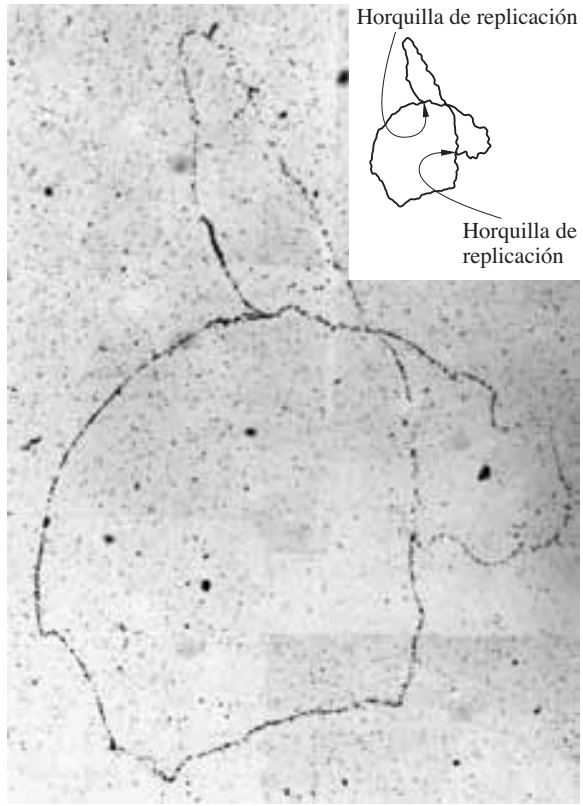


Figura 20.2 ▲
Replicación bidireccional del ADN en *Escherichia coli*. La replicación semiconservativa del ADN comienza en un origen único y avanza en ambas direcciones. La síntesis de nuevas hebras de ADN (gris claro) se efectúa en las dos horquillas de replicación, donde están los replisomas. Cuando las horquillas de replicación se encuentran en el sitio de terminación, se separan las dos moléculas de ADN de doble hebra. Nótese que cada molécula hija consiste en una hebra parental y una hebra recién sintetizada.



◀Figura 20.3
Autorradiografía de un cromosoma de *E. coli* en replicación. El ADN se marcó con ^{3}H-desoxitimidina, y la radiactividad se detectó sobreponiendo el cromosoma en replicación sobre una emulsión fotográfica. La autorradiografía muestra que el cromosoma de *E. coli* tiene dos horquillas de replicación.

replicación es bidireccional. Pero aunque el cromosoma de *E. coli* tiene un solo origen de replicación, los cromosomas de los eucariotas tienen varios sitios donde se inicia la síntesis del ADN (figura 20.4). Aunque la velocidad de movimiento de la horquilla en los eucariotas es menor que en las bacterias, la presencia de muchos orígenes independientes de replicación permite copiar a los mayores genomas eucarióticos aproximadamente en el mismo tiempo que los genomas procarióticos.

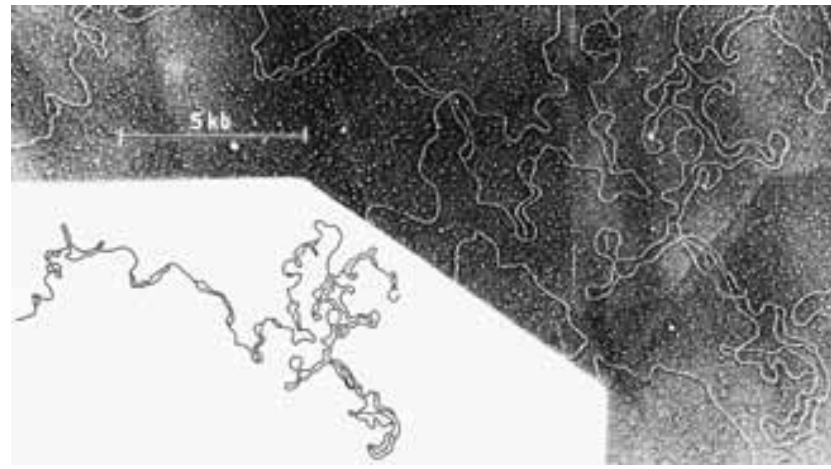


Figura 20.4 ▶
Micrografía electrónica de la replicación del ADN en un embrión de la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*. Nótese la gran cantidad de horquillas de replicación en los extremos opuestos de las "burbujas" de ADN duplicado.

20.2 ADN polimerasa

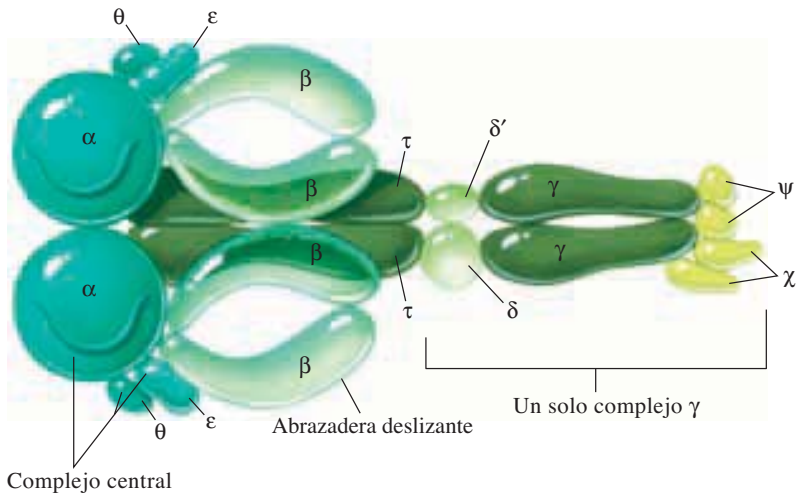
La síntesis de una nueva hebra de ADN se alcanza por la adición sucesiva de nucleótidos al extremo de una cadena creciente. Esa polimerización es catalizada por enzimas llamadas ADN polimerasas dirigidas por ADN, o simplemente ADN polimerasas. *E. coli* contiene tres ADN polimerasas diferentes; cada proteína se identifica con un número romano de acuerdo con el orden de su descubrimiento. La ADN polimerasa I repara ADN y participa en la síntesis de una de las hebras de ADN durante la replicación. La ADN polimerasa II tiene un papel en la reparación de ADN. La ADN polimerasa III es la principal enzima de replicación de ADN: es responsable del alargamiento de la cadena durante la replicación del ADN, y es la parte esencial del replisoma.

La ADN polimerasa III contiene 10 subunidades distintas de polipéptido, y es, con mucho, la mayor de las tres ADN polimerasas (tabla 20.1). La holoenzima purificada es un dímero asimétrico formado por dos copias de cada polipéptido, como se ve en la figura 20.5. Dentro de esta estructura, los polipéptidos α, ε y θ se combinan para formar dos complejos centrales, responsables de las reacciones de polimerización. Las subunidades β forman una abrazadera deslizante que rodea a cada una de las dos hebras de ADN en la horquilla de replicación. La mayor parte de las subunidades restantes forman el complejo γ o "tensor de la abrazadera", que ayuda en el ensamble del replisoma y también para mantener a la enzima unida al ADN parental durante las reacciones sucesivas de polimerización.

▲Arthur Kornberg (1918-) recibió el Premio Nobel en 1959 por su descubrimiento de la ADN polimerasa.

TABLA 20.1 Subunidades de la holoenzima ADN polimerasa III

Subunidad	M_r		Gen	Actividad
α	130 000	central	*polC/dna*E	Polimerasa
ε	27 000	central	*dnaQ/mut*D	Exonucleasa 3′ → 5′
θ	8846	central	*hol*E	?
β	40 000		*dna*N	Forma abrazadera deslizante
τ	71 000		*dna*X	Aumenta la dimerización del interior; ATPasa
γ	47 000	complejo γ	*dna*X	Aumenta la capacidad repetitiva; ayuda en ensamble de replisoma
δ	38 700	complejo γ	*hol*A	
δ'	36 900	complejo γ	*hol*B	
χ	16 600	complejo γ	*hol*C	
ψ	15 174	complejo γ	*hol*D	



◀Figura 20.5
Diagrama de la composición del ADN polimerasa III de *E. coli* en subunidades. La holoenzima consiste en dos complejos centrales (que contienen α, ε y θ), copias apareadas de β y τ, y un solo complejo γ (γ_3, δ, δ' con dos copias de cada ψ y χ). Por eso la estructura es un dímero asimétrico. Se han propuesto otros modelos de la estructura de la holoenzima. [Adaptado de O'Donnell, M. (1992). Accessory protein function in the DNA polymerase III holoenzyme from *E. coli*. *BioEssays* 14:105-111].

A. Elongación de la cadena; reacción de transferencia de grupo nucleotidilo

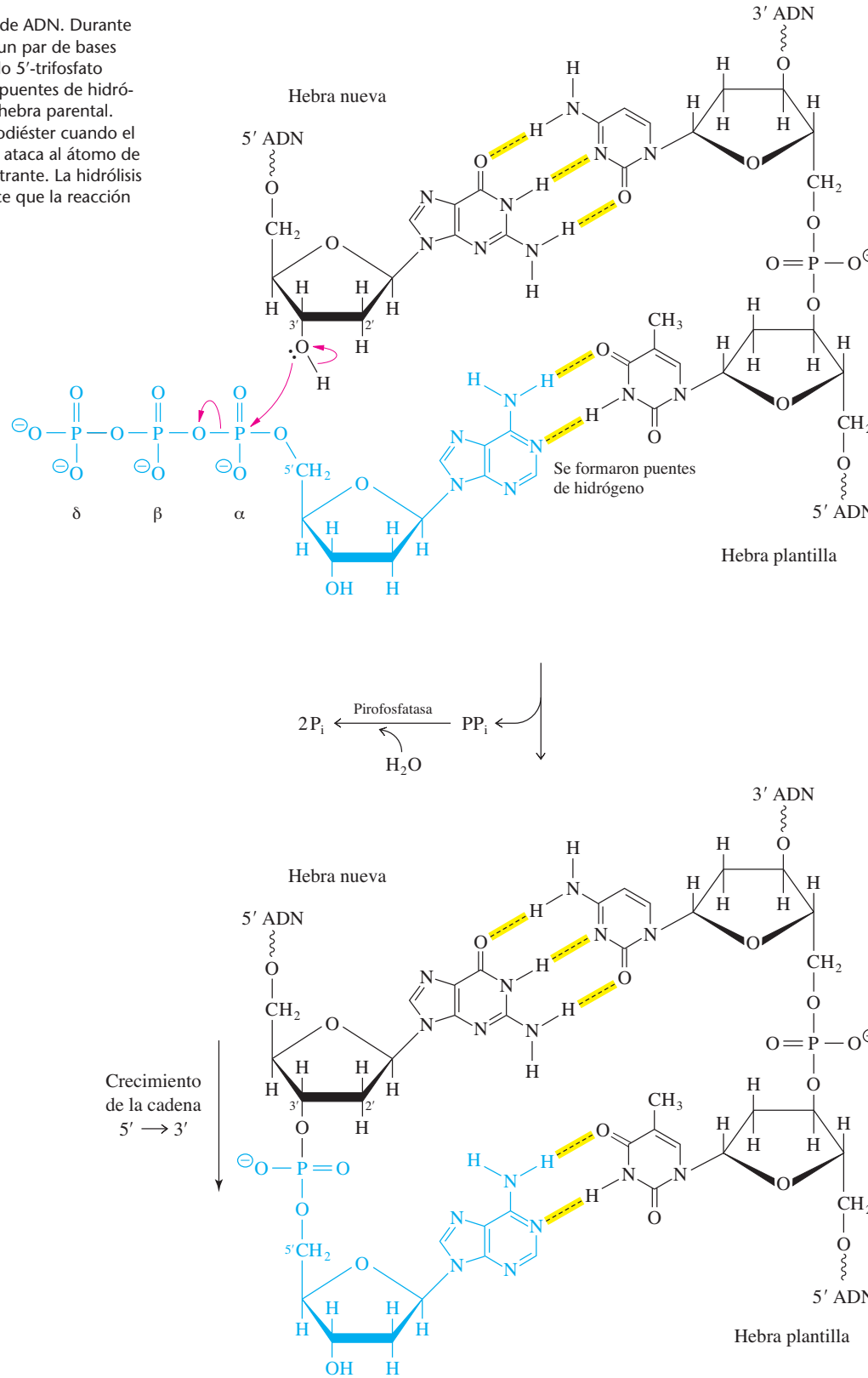
Virtualmente todas las ADN polimerasas, incluyendo la polimerasa III, sintetizan ADN agregando nucleótidos uno por uno al extremo 3′ de la cadena creciente. El sustrato de nucleótido es un desoxirribonucleósido 5′-trifosfato (dNTP). El nucleótido específico se determina por apareamiento de bases Watson-Crick a la hebra de la plantilla; la adenina (A) se aparea con la timina (T) y la guanina (G) se aparea con la citosina (C). Como la reserva de cada dNTP en una célula es aproximadamente igual, eso quiere decir que, en promedio, la enzima pasa tres cuartos de su tiempo discriminando contra dNTP incorrectos que se hayan difundido al sitio catalítico donde tratan de aparear bases con la hebra de la plantilla.

La ADN polimerasa III cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre el dNTP entrante y la cadena en crecimiento. Como se ve en la figura 20.6 de la página siguiente, el dNTP entrante forma un par de bases con un residuo de la hebra de plantilla. Una vez formado el par de bases correcto, el grupo 3′-hidroxilo libre de la cadena naciente de ADN hace un ataque nucleofílico al átomo de fósforo α del dNTP entrante. Esta reacción causa la adición de un nucleósido monofosfato y el desplazamiento de pirofosfato. La hidrólisis siguiente del pirofosfato, por abundante enzima pirofosfatasa, hace que la reacción de polimerización sea irreversible en esencia. La dirección de la polimerización (crecimiento de la cadena) se define como 5′ → 3′, y se lee por los átomos de carbono en el anillo de azúcar del residuo recién agregado.

Después de cada reacción de adición, la ADN polimerasa III avanza un residuo, se une un nuevo nucleótido, y se efectúa otra reacción de transferencia de grupo nucleotidilo. Este mecanismo asegura que la cadena nueva se extienda por la adición escalonada de nucleótidos sencillos que estén bien alineados por apareamientos de bases, con la hebra de plantilla. Como es de esperar, la ADN polimerasa III no puede sintetizar ADN en ausencia de una plantilla, ni puede adicionar moléculas en ausencia de un extremo 3′ de una cadena ya existente. En otras palabras, la ADN polimerasa III requiere tanto una plantilla como un cebador para que suceda la síntesis.

Como se indicó antes, la replicación de ADN en el interior de la célula se efectúa a una velocidad aproximada de 1 000 nucleótidos por segundo. Es la velocidad más rápida que se conoce de todas las de polimerización *in vivo*. Sin embargo, la velocidad de polimerización catalizada por ADN polimerasa III *in vitro* es mucho menor, lo que indica que la enzima aislada carece de algunos componentes necesarios para su actividad total. Sólo cuando se arma el replisoma completo la polimerización *in vitro* avanza aproximadamente con la misma velocidad que en el interior de la célula.

Figura 20.6 ▶
Elongación de una cadena de ADN. Durante la síntesis de ADN, se crea un par de bases cuando un desoxinucleósido 5′-trifosfato entrante (gris claro) forma puentes de hidrógeno con un residuo de la hebra parental. Se forma un enlace de fosfodiéster cuando el grupo hidroxilo 3′ terminal ataca al átomo de fósforo α del nucleótido entrante. La hidrólisis del pirofosfato liberado hace que la reacción sea irreversible.



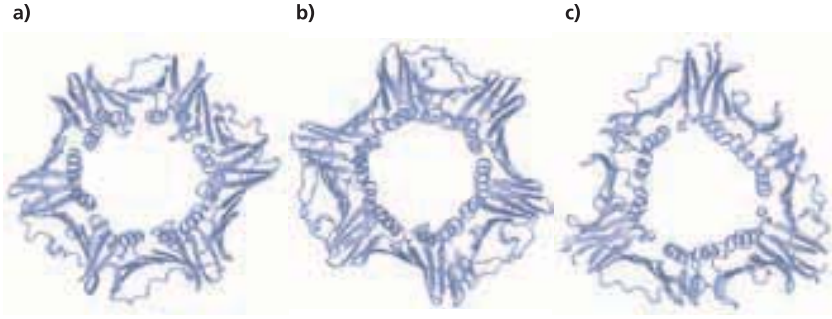
B. Permanencia de la ADN polimerasa III unida a la horquilla de replicación

Una vez iniciada la síntesis de ADN, la polimerasa permanece unida a la horquilla de replicación hasta que se completa la replicación. El extremo 3′ de la cadena creciente queda asociado al sitio activo de la enzima, en tanto que se adicionan muchos nucleótidos uno tras otro. Las enzimas que permanecen unidas a sus cadenas nacientes durante muchos pasos de polimerización se llaman **procesivas.** (Lo contrario de procesivas es **distributivas**; una enzima distributiva se disocia de la cadena creciente después de la adición de cada monómero). Como parte del replisoma, la holoenzima ADN polimerasa III es muy procesiva. Eso quiere decir que sólo se necesita una pequeña cantidad de moléculas de ADN polimerasa III para replicar todo el cromosoma. La procesividad también explica la gran velocidad de replicación del ADN.

La procesividad de la holoenzima ADN polimerasa III se debe, en parte, a las subunidades β de la enzima. Esas subunidades no tienen actividad propia, pero cuando están ensambladas en la holoenzima forman un anillo que puede rodear por completo a la molécula de ADN. El anillo se forma con dos subunidades β que forman un dímero cabeza con cola. Cada una de las subunidades contiene tres dominios similares, formados por un pliegue β de emparedado con dos hélices α en la orilla interior, que interactúan con ADN (figura 20.7). Las subunidades β funcionan así como una abrazadera deslizante, asegurando la polimerasa al sustrato de ADN. Como se verá después, al incorporarse la ADN polimerasa III a una máquina de proteínas aún mayor en la horquilla de replicación, se asegura más que la enzima permanezca asociada a las cadenas nacientes de ADN durante la polimerización. Muchos otros sistemas de replicación de ADN caracterizados bioquímicamente han evolucionado para llegar a la misma estrategia de apresurar (hacer más eficiente) la replicación de ADN. Por ejemplo, dos bacteriófagos relacionados, T_4 y RB69, codifican una proteína accesoria de replicación, gp45, que forma una abrazadera circular (figura 20.7). Esta estructura de abrazadera asegura las respectivas ADN polimerasas codificadas por fago en sus sustratos de ADN, y aumenta la procesividad. La figura 20.8, en la página siguiente, muestra un modelo de cómo es probable que trabaje eso *in vivo* para la ADN polimerasa de bacteriófago unida a ADN. La abrazadera deslizante rodea a la región de doble hebra del ADN e interactúa con las subunidades que contienen la actividad de polimerasa, que se unen a la región de una hebra de la horquilla de replicación. Es notable que también las ADN polimerasas eucarióticas parezcan usar la misma estrategia (descrita más adelante, en la sección 20.6) para sujetarse a sus sustratos (figura 20.7).

C. Lectura de prueba para corregir errores

La holoenzima ADN polimerasa III también posee una actividad de 3′ → 5′ exonucleasa. Esta exonucleasa, cuyos sitios activos están principalmente dentro de la subunidad ε, puede catalizar la hidrólisis del enlace fosfodiéster que une al residuo terminal 3′ con el resto de la cadena de polinucleótido en crecimiento. Así, la holoenzima ADN



◀Figura 20.7
Las ADN polimerasas pueden usar abrazaderas de anillos deslizantes para aumentar la procesividad. Estas tres estructuras cristalinas muestran la evolución convergente de la estructura y las funciones. **a)** La subunidad β de la ADN polimerasa III de *E. coli.* **b)** Antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) que hace la misma función en las arqueobacterias. **c)** El gp45 del bacteriófago T4 también es un anillo deslizante que sujeta a la ADN polimerasa en su sustrato de ADN.

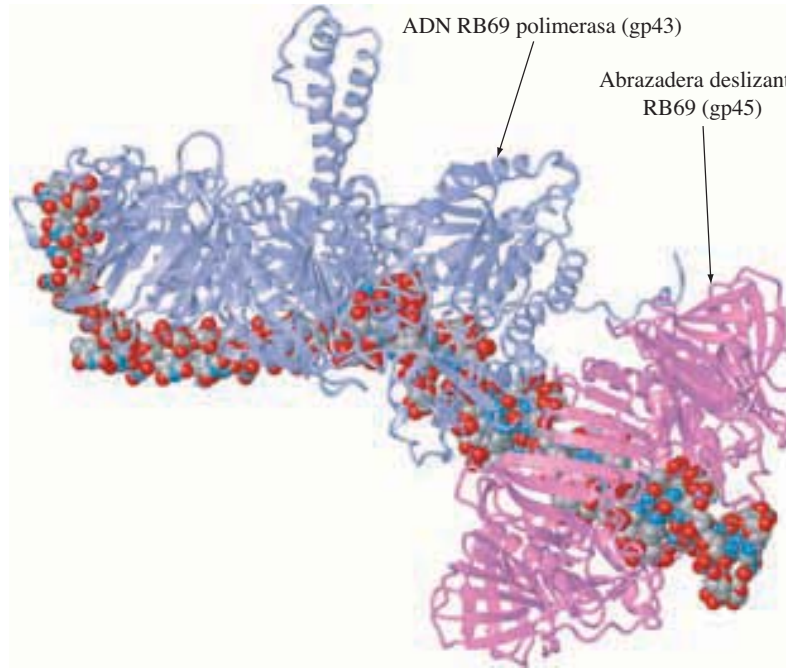


Figura 20.8 ▶
Modelo de ADN polimerasa de bacteriófago unida a ADN. La abrazadera deslizante (púrpura) rodea al ADN de doble hebra recién sintetizado. La subunidad que contiene el sitio activo se muestra en azul. El extremo 3′ de la hebra naciente se coloca en el sitio activo, y la región de una hebra, de la hebra de plantilla, se extiende hacia la izquierda. La ADN polimerasa se mueve de derecha a izquierda a medida que se extiende la hebra naciente. [PDB 1WAI]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

polimerasa III puede catalizar tanto la elongación como la degradación de la cadena. La actividad de exonucleasa permite que la holoenzima "corrija" o "edite" el ADN recién sintetizado, para corregir pares de bases mal apareados. Cuando la ADN polimerasa III reconoce una distorsión en el ADN producido por una base mal apareada, la actividad exonucleasa de la enzima cataliza la eliminación del nucleótido mal apareado antes de que continúe la polimerización.

Más o menos en uno de cada 10^5 pasos de polimerización se incorpora una base incorrecta, lo que equivale a una frecuencia aproximada de errores de 10^{-5}. La misma actividad correctora $3' \rightarrow 5'$ de la exonucleasa tiene una tasa aproximada de error de 10^{-2}. La combinación de esas dos reacciones consecutivas resulta en una tasa de error para la polimerización de 10^{-7}. Es una de las menores tasas de error de cualquier enzima. La mayor parte de esos errores de replicación se reparan después, mediante enzimas de reparación de ADN separadas (sección 20.7), y la tasa total de error para la replicación de ADN es entre 10^{-9} y 10^{-10}. A pesar de esta impresionante exactitud, son comunes los errores de replicación cuando se duplican genomas grandes. (Recuérdese que el genoma humano contiene 3.2×10^9 pares de bases; eso quiere decir que, en promedio, cada vez que se replica el genoma un error se transmite a una o dos células hijas).

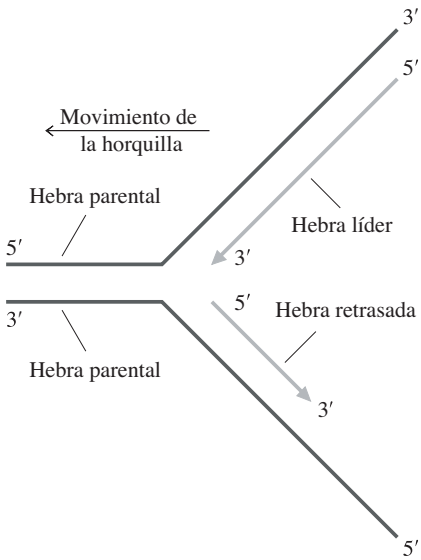


Figura 20.9 ▲
Diagrama de la horquilla de replicación. Las dos hebras recién sintetizadas tienen polaridad opuesta. En la hebra líder, la síntesis de $5' \rightarrow 3'$ avanza en la misma dirección; en la hebra retrasada, la síntesis $5' \rightarrow 3'$ avanza en dirección opuesta.

20.3 Síntesis simultánea de dos hebras por la ADN polimerasa

La ADN polimerasa cataliza la elongación de la cadena sólo en la dirección $5' \rightarrow 3'$, como se ve en la figura 20.6. Como las dos hebras de ADN son antiparalelas, la síntesis $5' \rightarrow 3'$ usando una hebra de plantilla avanza en la misma dirección que el movimiento de la horquilla, pero la síntesis $5' \rightarrow 3'$ usando la otra hebra de plantilla sucede en la dirección contraria al movimiento de la horquilla (figura 20.9). La nueva cadena formada por polimerización en la misma dirección que la del movimiento de la horquilla se llama hebra líder. La nueva hebra formada por polimerización en la dirección contraria se llama hebra retrasada. Recuérdese que el dímero de la holoenzima ADN

polimerasa III contiene dos complejos centrales que pueden catalizar la polimerización. Uno de ellos es responsable de la síntesis de la hebra líder y el otro de la síntesis de la hebra retrasada.

A. Síntesis discontinua de la hebra retrasada

La hebra líder se sintetiza en forma de un polinucleótido continuo, comenzando en el origen y terminando en el sitio de terminación. En contraste, la hebra retrasada se sintetiza en forma discontinua, en tramos cortos, y en dirección contraria al movimiento de la horquilla. Estos tramos de hebra retrasada se unen entonces por una reacción separada. En la sección 20.4 se presentará un modelo de la horquilla de replicación que explica cómo puede sintetizar un complejo enzimático a las dos hebras en forma simultánea.

Un experimento que ilustra la síntesis discontinua del ADN se muestra en la figura 20.10. El ADN de *E. coli* se marca con un pulso corto de ^{3}H-desoxitimidina. Las moléculas recién fabricadas de ADN se aíslan entonces, se desnaturalizan y se separan por tamaños. El experimento detecta dos tipos de moléculas marcadas con ADN: moléculas muy grandes de ADN que en conjunto contienen más o menos la mitad de la radiactividad del ADN parcialmente replicado, y fragmentos más cortos de ADN, de unos 1 000 residuos, que en conjunto contienen la otra mitad de la radiactividad. Las moléculas grandes de ADN proceden de la síntesis continua de la hebra líder; los fragmentos más cortos proceden de la síntesis discontinua de la hebra retrasada. Los tramos cortos de hebra retrasada de ADN se llaman **fragmentos de Okazaki** en honor de su descubridor, Reiji Okazaki. El mecanismo general de replicación de ADN se llama semidiscontinuo, para subrayar los distintos mecanismos para replicar cada hebra.

B. Cada fragmento de Okazaki comienza con un ARN cebador

Es claro que la síntesis de la hebra retrasada es discontinua, pero no es obvio cómo se inicia la síntesis de cada fragmento de Okazaki. El problema es que ninguna ADN polimerasa puede iniciar la polimerización; sólo puede agregar nucleótidos a polímeros existentes. Esta limitación no presenta dificultades para la síntesis de la hebra líder, porque una vez que esa síntesis de ADN se está efectuando, se agregan nucleótidos en forma continua a una cadena creciente. Sin embargo, en la hebra retrasada la síntesis de cada fragmento de Okazaki requiere un nuevo evento de iniciación. Eso se hace formando trozos cortos de ARN en la horquilla de replicación. Estos cebadores de ARN son complementarios a la plantilla de la hebra retrasada. La ADN polimerasa extiende cada cebador desde su extremo 3′ para formar un fragmento de Okazaki, como se ve en la figura 20.11 de la página siguiente. (La síntesis de la hebra líder también se inicia con un cebador de ARN, pero sólo se requiere ese único cebador para toda la hebra).

El uso de cebadores cortos de ARN evita la limitación impuesta por el mecanismo de la ADN polimerasa, es decir, que no puede iniciar desde la nada la síntesis de ADN. Los cebadores son sintetizados por una enzima ARN polimerasa dependiente de ADN, llamada **primasa**, que es producto del gen *dna*G en *E. coli*. La estructura cristalina tridimensional del dominio catalítico de dnaG revela que su plegamiento y su sitio activo son distintos a los de las muy estudiadas polimerasas, lo que parece indicar que puede emplear un mecanismo enzimático novedoso. La primasa es parte de un complejo mayor llamado **primosoma**, que contiene muchos otros polipéptidos además de la primasa. El primosoma, junto con la ADN polimerasa III, es parte del replisoma.

Al avanzar la horquilla de replicación, se desenrolla el ADN parental y quedan expuestos más ADN de una hebra. Más o menos una vez por segundo, la primasa cataliza la síntesis de un ARN cebador corto usando este ADN de una hebra como plantilla. Los cebadores sólo tienen pocos nucleótidos de longitud. Como la horquilla de replicación avanza a una velocidad aproximada de 1 000 nucleótidos por segundo, se sintetiza un cebador más o menos cada 1 000 nucleótidos que se incorporan. La ADN polimerasa III cataliza la síntesis de ADN en dirección 5′ ⟶ 3′ al prolongar cada ARN cebador corto.

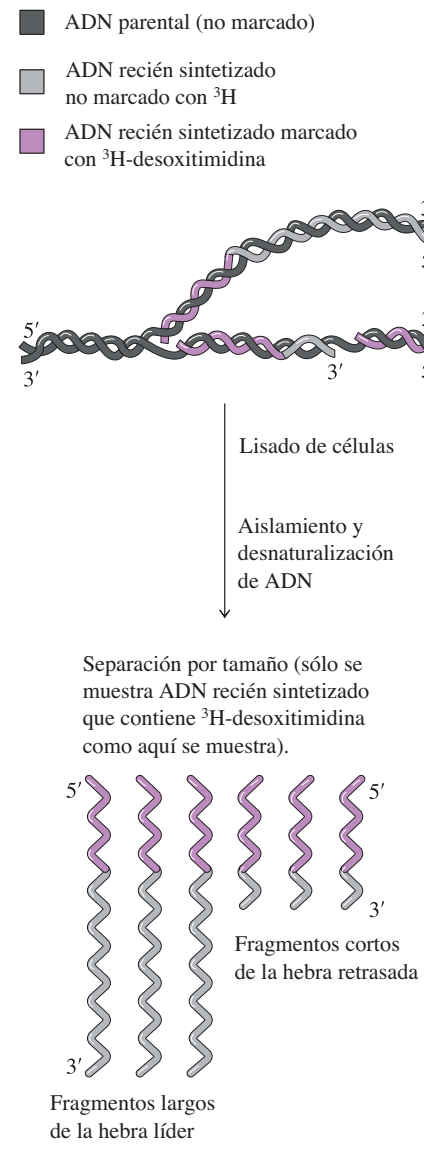


Figura 20.10 ▲
Síntesis discontinua de ADN demostrada por análisis de ADN recién sintetizado. Las moléculas nacientes de ADN se marcan en *E. coli* con un pulso corto de ^{3}H-desoxitimidina. Las células se lisan, se aísla el ADN y se separan las hebras por tamaños. Las moléculas marcadas de ADN caen en dos clases: moléculas largas, provenientes de la síntesis continua de la hebra líder, y fragmentos cortos debidos a síntesis discontinua de la hebra retrasada. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

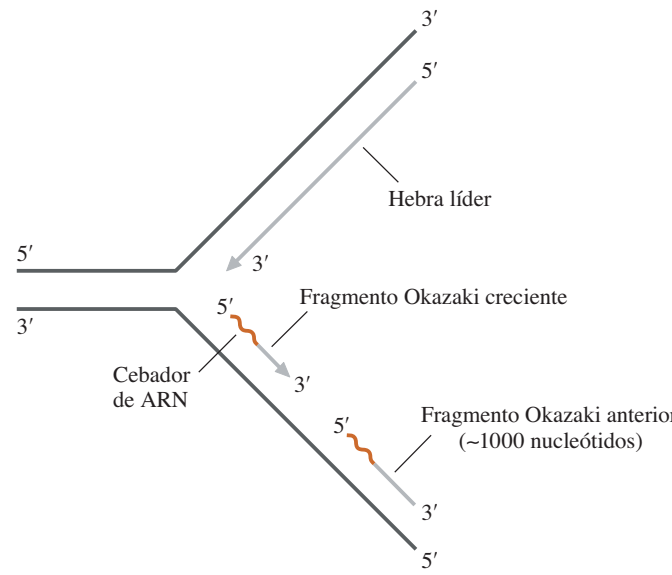


Figura 20.11 ▶
Diagrama de la síntesis de hebra retrasada. Un tramo corto de ARN (café) sirve como cebador para la síntesis de cada fragmento Okazaki. La longitud del fragmento Okazaki se determina por la distancia entre los cebadores sucesivos de ARN. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

C. Unión de fragmentos de Okazaki por acción de ADN polimerasa I y ADN ligasa

Al final, los fragmentos de Okazaki se unen para producir una cadena continua de ADN. Esta reacción se efectúa en tres pasos: eliminación del ARN cebador, síntesis del ADN de repuesto y sellado de los fragmentos adyacentes de ADN. Los pasos se efectúan por la acción combinada de ADN polimerasa I y ADN ligasa.

La ADN polimerasa I de *E. coli* fue descubierta por Arthur Kornberg hace unos 45 años. Fue la primera enzima en encontrarse que puede catalizar la síntesis de ADN usando una hebra de plantilla. En un solo polipéptido, la ADN polimerasa I contiene las actividades de la holoenzima ADN polimerasa III: actividad de polimerasa 5′ → 3′ y actividad exonucleasa de corrección 3′ → 5′. Además, la ADN polimerasa I tiene actividad de exonucleasa 5′ → 3′, que no se encuentra en la ADN polimerasa III.

La ADN polimerasa I se puede dividir con ciertas enzimas proteolíticas para generar un fragmento pequeño que contiene la actividad exonucleasa 5′ → 3′ y un fragmento mayor que retiene las actividades de polimerización y corrección. El fragmento mayor consiste en los 605 residuos de aminoácido C-terminales, y el fragmento menor contiene los restantes 323 residuos N-terminales. El fragmento mayor se llama fragmento Klenow, y se usa mucho para secuenciar ADN y en muchas otras técnicas que necesitan síntesis de ADN sin degradación 5′ → 3′. Además, muchos estudios de los mecanismos de síntesis y corrección de ADN usan el fragmento de Klenow como modelo para ADN polimerasas más complicadas.

La figura 20.12 muestra la estructura del fragmento de Klenow acomplejado con un fragmento de ADN que contiene un par terminal de bases mal apareado. El extremo 3′ de la hebra naciente está colocado en el sitio de la exonucleasa 3′ → 5′ en la enzima. Durante la polimerización, la hebra de plantilla ocupa la ranura en la parte superior de la estructura, y la enzima enlaza al menos 10 pares de bases de ADN de doble hebra, como se ve en la figura. Muchos de los residuos de aminoácido que intervienen en el enlazamiento de ADN son parecidos en todas las ADN polimerasas, aunque, por lo demás, puede ser que las enzimas sean muy distintas en estructura tridimensional y en secuencia de aminoácidos.

La actividad exonucleasa 5′ → 3′ única de la ADN polimerasa I elimina el ARN cebador al principio de cada fragmento de Okazaki. (Como no es parte del fragmento de Klenow, no se muestra la exonucleasa 5′ → 3′ en la figura 20.12, pero estaría ubicado en la parte superior de la estructura, junto a la ranura donde entra la hebra de plantilla). Al eliminarse el cebador, la polimerasa sintetiza ADN para rellenar la región entre los fragmentos de Okazaki, y a ese proceso se le llama **traslación de muesca** (figura 20.13). En la traslación de muescas, la ADN polimerasa I reconoce y se une a la muesca entre

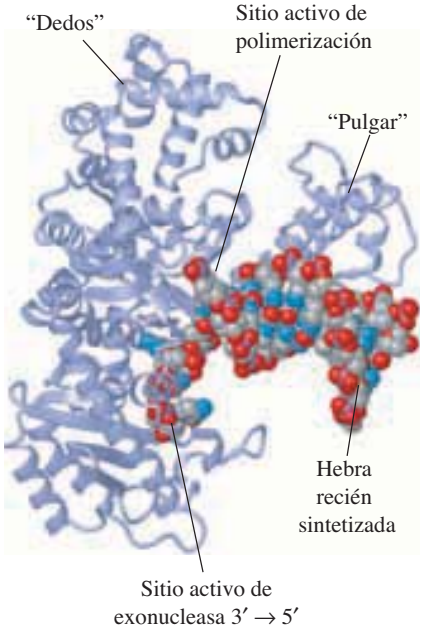
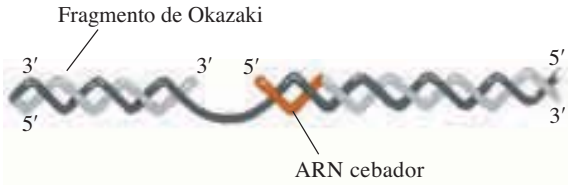
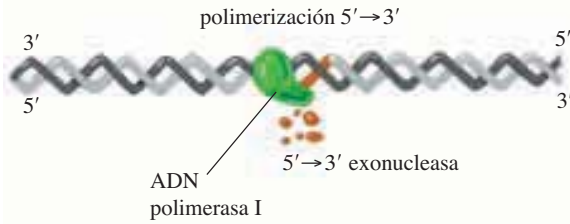


Figura 20.12 ▲
Estructura del fragmento Klenow con un fragmento de ADN unido. La enzima rodea al ADN. El extremo 3′ de la hebra naciente se acomoda en el sitio de la exonucleasa 3′ → 5′ (izquierda abajo). Durante la síntesis *in vivo* del ADN, la hebra plantilla se extiende saliendo de la región de doble hebra que se muestra en la estructura cristalina. [PDB 1KLN]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

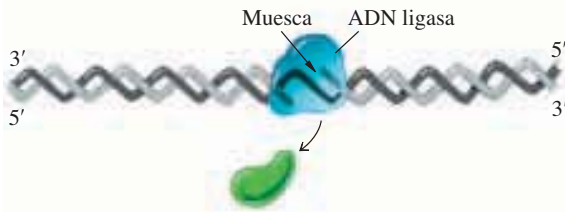
a) Unión de fragmentos Okazaki por la acción combinada de ADN polimerasa I y ADN ligasa.



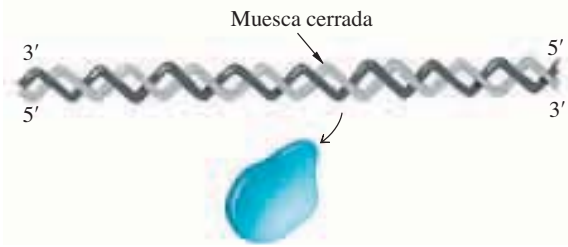
b) La ADN polimerasa I prolonga el fragmento de Okazaki, en tanto que su actividad de exonucleasa 5′→3′ elimina al ARN cebador. Este proceso se llama traslación de muesca y da como resultado el movimiento de la muesca a lo largo de la hebra retrasada.



c) La ADN polimerasa I se disocia después de prolongar 10 a 12 nucleótidos el fragmento de Okazaki. La ADN ligasa se une a la muesca.



d) La ADN ligasa cataliza la formación de un enlace fosfodiéster, que sella la muesca y crea una hebra retrasada continua. A continuación la hebra se disocia del ADN.



el extremo 3′ de un fragmento de Okazaki y el extremo 5′ del siguiente cebador. Entonces, la exonucleasa 5′ → 3′ cataliza la eliminación hidrolítica del primer nucleótido de

◀Figura 20.13
Unión de fragmentos Okazaki por la acción combinada de ADN polimerasa I y ADN ligasa. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

ARN, en tanto que la polimerasa 5′ → 3′ adiciona un desoxinucleótido al extremo 3′ de la cadena de ADN. De esta forma, la enzima recorre la muesca a lo largo de la hebra. Después de completar 10 a 12 ciclos de hidrólisis y polimerización, la ADN polimerasa I se disocia del ADN dejando atrás dos fragmentos de Okazaki separados por una muesca en el esqueleto de fosfodiéster. La eliminación de ARN cebadores por la ADN polimerasa I es parte esencial de la replicación del ADN, porque el producto final debe estar formado totalmente por ADN de doble hebra.

El último paso en la síntesis de la hebra retrasada de ADN es la formación de una unión fosfodiéster, entre el grupo 3′-hidroxilo en el extremo de un fragmento de Okazaki, y el grupo 5′-fosfato de un fragmento de Okazaki adyacente. Este paso es catalizado por la ADN ligasa. Las ADN ligasas en las células eucarióticas y en células infectadas por bacteriófagos requieren ATP como cosustrato. En contraste, la ADN ligasa de *E. coli* usa $NAD^{\oplus}$ como cosustrato. El $NAD^{\oplus}$ es la fuente del grupo nucleotidilo que se transfiere, primero a la enzima y después al ADN, para crear un ADP-ADN intermedio. El mecanismo propuesto de la ADN ligasa en *E. coli* se ve en la figura 20.14. La reacción neta es

$$\text{ADN (con muesca)} + NAD^{\oplus} \longrightarrow \text{ADN (sellado)} + NMN^{\oplus} + \text{AMP} \qquad \textbf{(20.1)}$$

20.4 Modelo del replisoma

El replisoma contiene un primosoma, la holoenzima ADN polimerasa III y otras proteínas que se requieren en la replicación de ADN. El ensamble de muchas proteínas para formar una sola máquina permite la síntesis coordinada de las hebras líder y retrasada en la horquilla de replicación.

La plantilla para la ADN polimerasa III es ADN de una hebra. Eso quiere decir que las dos hebras de la doble hélice parental deben desenrollarse y separarse durante la replicación. Ese desenrollamiento se hace principalmente con una clase de proteínas llamadas helicasas. En *E. coli*, la helicasa DnaB se requiere para la replicación del ADN. La DnaB es una de las subunidades del primosoma, que a su vez es parte del replisoma mayor. Así, la rapidez de desenrollamiento de ADN se acopla en forma directa con la rapidez de polimerización, a medida que el replisoma se mueve a lo largo del cromosoma. El destorcimiento es ayudado por las acciones de diversas topoisomerasas (sección 19.3) que alivian el sobreenrollamiento adelante y detrás de la horquilla de replicación. Esas enzimas no son parte del replisoma, pero se requieren para la replicación. La topoisomerasa más importante en *E. coli* es la topoisomerasa II, o girasa. Los mutantes que carecen de esta enzima no pueden replicar su molécula de ADN. Nótese que la síntesis de ADN se acopla al desenrollamiento de la molécula de ADN. El resultado final es la producción de dos moléculas hijas, cada una con una hebra recién sintetizada y una hebra parental, como se ve en la figura 20.1. Nunca, durante la replicación de ADN, hay un tramo importante de ADN de una hebra, además del que se encuentra en la plantilla de hebra retrasada.

Otra proteína que es parte del replisoma es la proteína de unión a hebra sencilla (SSB, *single-strand binding protein*), llamada también proteína desestabilizante de hélice. La SSB se une a ADN de una hebra y evita que se doble hacia atrás sobre sí mismo y forme regiones de doble hebra. El replisoma contiene muchas moléculas de SSB, que existen como tetrámeros (M_r de subunidad 18 000). Cada tetrámero cubre unos 32 nucleótidos de ADN. La unión de SSB con ADN es cooperativa, esto es, el enlazamiento del primer tetrámero facilita al del segundo, y así sucesivamente. La presencia de varias moléculas adyacentes de SSB en un ADN de una hebra produce una conformación de ADN extendida y relativamente inflexible. Como no tiene estructura secundaria, el ADN de una hebra recubierto con SSB es una plantilla ideal para la síntesis de la hebra complementaria durante la replicación del ADN.

En la figura 20.15, en las páginas 628 y 629, se ve un modelo de síntesis de ADN por el replisoma. El primosoma con la primasa y la helicasa está en la cabeza de la horquilla de replicación, seguido de una holoenzima ADN polimerasa III. (Para simplificar la figura, sólo se muestran los complejos centrales de la ADN polimerasa III). A medida que la helicasa destuerce al ADN, la primasa sintetiza un cebador de ARN aproximadamente

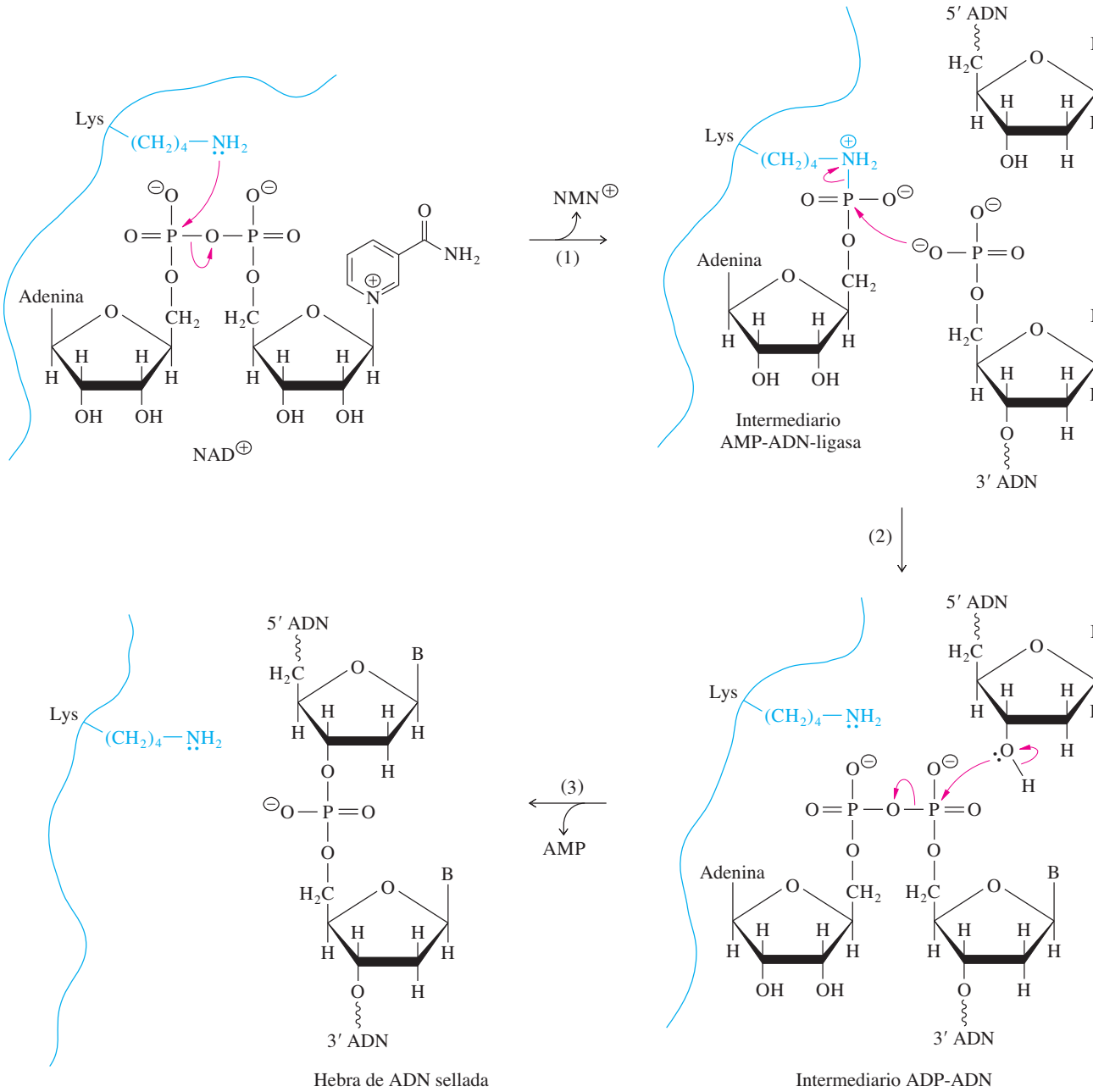
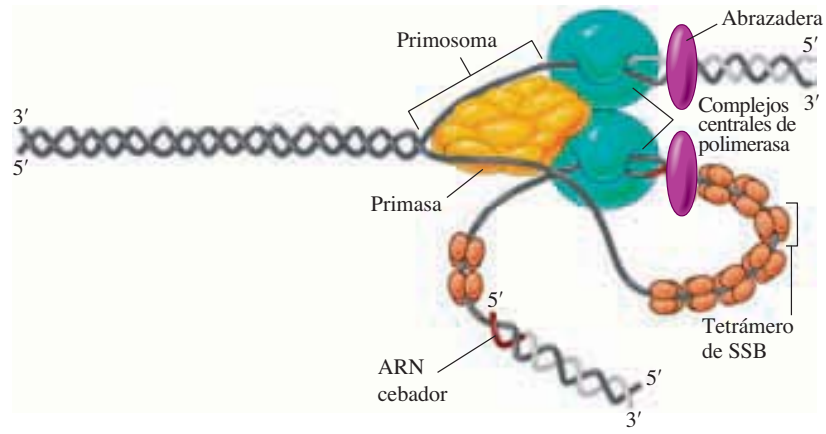


Figura 20.14 ▲
Mecanismo propuesto de ADN ligasa en *E. coli*. Usando $NAD^{\oplus}$ como cosustrato, la ADN ligasa cataliza la formación de un enlace fosfodiéster en una muesca en el ADN. En el paso 1, el grupo ε-amino de un residuo de lisina en la ADN ligasa ataca al átomo de fósforo unido al átomo de oxígeno en 5′ de la parte de adenosina en el $NAD^{\oplus}$. El mononucleótido de nicotinamida ($NMN^{\oplus}$) se desplaza y genera un intermedio AMP-ADN-ligasa. (Con ADN ligasas que usan ATP como cosustrato, el que se desplaza es pirofosfato). En el paso 2, un átomo de oxígeno del grupo 5′-fosfato libre en el ADN ataca al grupo fosfato del complejo AMP-enzima, formando un intermediario ADP-ADN. En el paso 3, el grupo nucleofílico 3′-hidroxilo en el residuo terminal de la hebra adyacente de ADN ataca al grupo 5′-fosfato activado en el ADP-ADN, liberando AMP y generando un enlace fosfodiéster que sella la muesca en la hebra de ADN. B representa a cualquier base.

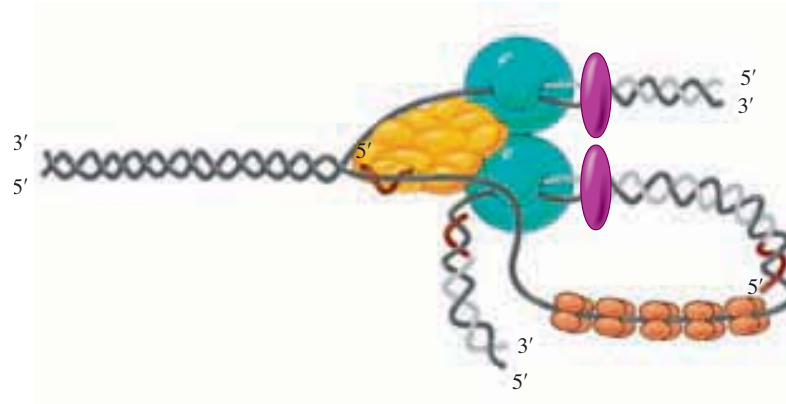
una vez cada segundo. Uno de los dos complejos centrales en el dímero de holoenzima sintetiza la hebra líder en forma continua, en la dirección 5′ → 3′, en tanto que el otro

Figura 20.15 ▶
Síntesis simultánea de hebras líder y retrasada en una horquilla de replicación. El replisoma contiene la holoenzima ADN polimerasa III (sólo se muestran los complejos centrales), un primosoma que contiene primasa, una helicasa y otras subunidades, así como complementos adicionales, incluyendo la proteína de unión de una hebra (SSB). Un complejo central de la holoenzima sintetiza la hebra líder, en tanto que el otro complejo central sintetiza la hebra retrasada. La plantilla de la hebra retrasada se dobla hacia atrás a través del replisoma, para que se puedan sintetizar las hebras líder y retrasada en la misma dirección que el movimiento de la horquilla. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

a) La plantilla de hebra retrasada se tuerce hacia atrás por el replisoma para que las hebras líder y retrasada se sinteticen en la misma dirección. La SSB se une al ADN de una hebra.



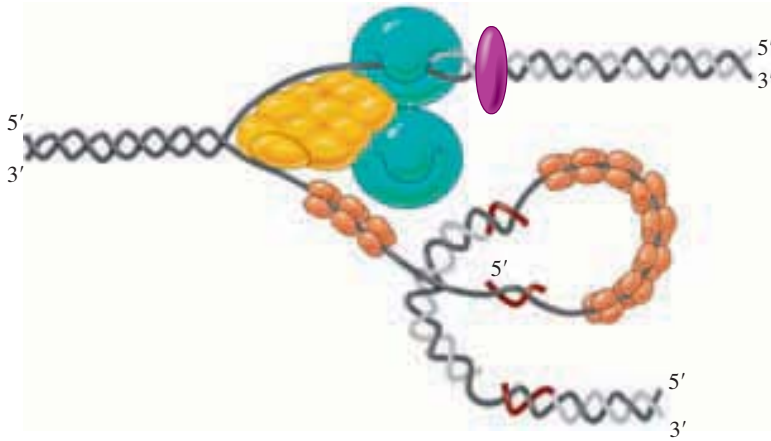
b) Como la helicasa destuerce la plantilla de ADN, la primasa sintetiza un cebador de ARN. La polimerasa de hebra retrasada completa un fragmento de Okazaki.



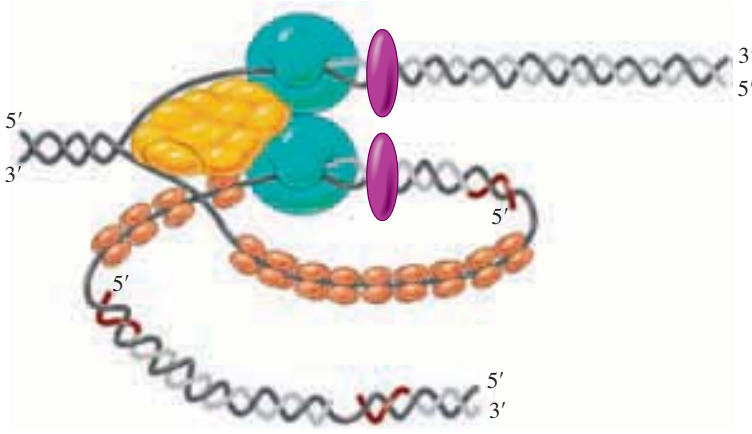
prolonga los ARN cebadores para formar fragmentos de Okazaki. Se cree que la plantilla de hebra retrasada se dobla hacia atrás y forma un bucle grande. La configuración permite que tanto la hebra líder como la retrasada sean sintetizadas en la misma dirección que la del movimiento de la horquilla.

Aunque los dos complejos centrales de la holoenzima ADN polimerasa III se dibujan en el modelo como equivalentes, funcionan un poco diferente: uno permanece unido firmemente a la plantilla de la hebra líder, en tanto que el otro se une a la hebra retrasada hasta que encuentra al ARN cebador del fragmento de Okazaki previamente sintetizado. En ese momento, el complejo central suelta a la plantilla de hebra retrasada. Esta plantilla de hebra retrasada se vuelve a asociar a la holoenzima en el sitio del siguiente cebador, y la síntesis continúa (figura 20.15d). Toda la holoenzima es procesiva en extremo, ya que la mitad de ella permanece asociada a la hebra líder desde el inicio de la replicación hasta la terminación, en tanto que la otra mitad sintetiza, en forma procesiva, tramos de 1 000 nucleótidos en la hebra retrasada. El complejo γ de la holoenzima ayuda a unirse y soltar a la plantilla de la hebra retrasada, participando en la eliminación y reensamble de la abrazadera deslizante formada por subunidades β.

c) Cuando la polimerasa de hebra atrasada se encuentra con el fragmento Okazaki anterior, libera la hebra retrasada.



d) La polimerasa de hebra retrasada se une a un cebador recién sintetizado y comienza a sintetizar otro fragmento de Okazaki.



El modelo del replisoma explica cómo se coordina la síntesis de las hebras líder y retrasada. La estructura del replisoma también asegura que todos los componentes necesarios para la replicación estén disponibles en el momento preciso, en la cantidad correcta y en el lugar adecuado. A los complejos de proteínas que funcionan al unísono para efectuar una tarea bioquímica se les llama con frecuencia máquinas de proteína. El replisoma es un ejemplo de máquina de proteína, como también el complejo de ATP sintasa (capítulo 14), el centro de reacción fotosintética (capítulo 15) y varios otros que se describirán en los capítulos siguientes.

20.5 Iniciación y terminación de la replicación de ADN

Como se hizo notar antes, la replicación del ADN se inicia en una secuencia específica del ADN llamada origen. En *E. coli*, a este sitio se le llama *ori*C, y está localizado más o menos en el sitio del 10 en un reloj, en el mapa genético del cromosoma (figura 20.16). El ensamble inicial de los replisomas en *ori*C depende de las proteínas que se unen a este sitio, y causan destorcimiento local de ADN. Una de esas proteínas, la DnaA, está

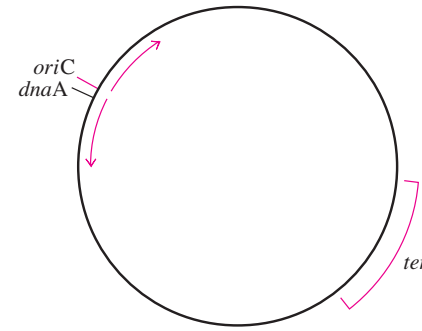


Figura 20.16 ▲
Lugar del origen (*ori*C) y término (*ter*) de la replicación de ADN en *E. coli*. El *dnaA* es el gen para la proteína DnaA, que se requiere para iniciar la replicación. La distancia entre *ori*C y *dna*A es 40 kb, aproximadamente. Las flechas rojas indican la dirección del movimiento de las horquillas de replicación.

Figura 20.17 ▲
Estructura de Tus (sustancia de utilización del terminador) de *E. coli* unida a ADN. La Tus se une a secuencias específicas en el sitio de terminación de la replicación del ADN. La proteína enlazada bloquea el movimiento del replisoma. [PDB 1ECR]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

codificada por el gen *dna*A, que está muy cerca del origen. La DnaA ayuda a regular la replicación de ADN controlando la frecuencia de iniciación. Es probable que los ARN cebadores necesarios para la síntesis de la hebra líder sean fabricados por los primosomas en el origen.

La terminación de la replicación en *E. coli* sucede en el sitio de terminación (*ter*), una región opuesta al origen en el cromosoma circular. Esta región contiene secuencias de ADN que son sitios de unión de una proteína llamada sustancia de utilización del terminador (Tus, *terminator utilization substance*). En la figura 20.17 se ve la estructura de la Tus unida a un solo sitio de terminación. Las regiones de la hebra β están en el surco mayor del ADN, donde las cadenas laterales de aminoácido hacen contacto con los pares de bases y reconocen la secuencia *ter*. La Tus evita que las horquillas de replicación pasen por la región, inhibiendo la actividad de replicasa en el helisoma. El sitio de terminación contiene también secuencias de ADN que tienen un papel en la separación de los cromosomas hijos cuando se termina la replicación del ADN.

20.6 Replicación de ADN en eucariotas

El mecanismo de replicación de ADN en los procariotas y en los eucariotas es fundamentalmente parecido. En los eucariotas, como en *E. coli*, la síntesis de la hebra líder es continua y la de la hebra retrasada es discontinua. Además, tanto en los procariotas como en los eucariotas, la síntesis de la hebra retrasada es un proceso en etapas, formado por: síntesis de cebador, síntesis de fragmento de Okazaki, hidrólisis de cebador y rellenado del hueco por una polimerasa. La primasa eucariótica, igual que la procariótica, sintetiza un cebador corto una vez por segundo, en la plantilla de hebra retrasada. Sin embargo, como la horquilla de replicación avanza con más lentitud en los eucariotas, cada fragmento de Okazaki sólo tiene una longitud de 100 a 200 residuos de nucleótido, bastante más cortos que en los procariotas. Es interesante que la ADN primasa eucariótica (y arqueobacteriana) no comparte una importante homología de secuencia con la enzima procariótica, ni la primasa eucariótica contiene algunas de las características estructurales clásicas de ADN polimerasas, como los dominios de "dedos" o del "pulgar" (figura 20.12). Como se describió en la sección 20.3, la primasa bacteriana también define una familia distinta de polimerasas, lo que parece indicar que la capacidad de sintetizar un ARN cebador para iniciación de ADN haya evolucionado en forma independiente, dos veces cuando menos. Como muchas de las demás enzimas que efectúan replicación de ADN en eucariotas no se han identificado ni caracterizado en forma tan completa como las enzimas de *E. coli*, con frecuencia se deducen las funciones, y a veces la existencia, de enzimas eucarióticas de acuerdo con las enzimas procarióticas.

La mayor parte de las células eucarióticas contienen cuando menos cinco ADN polimerasas diferentes, llamadas α, β, γ, δ y ε (tabla 20.2). Las ADN polimerasas α, δ y ε son responsables de las reacciones de alargamiento de la cadena en la replicación del ADN, y de algunas reacciones de reparación. La ADN polimerasa β es una enzima de reparación de ADN que se encuentra en el núcleo, y la ADN polimerasa γ tiene un papel en la replicación del ADN mitocondrial. Una sexta ADN polimerasa se encarga de replicar ADN en los cloroplastos.

La ADN polimerasa δ cataliza la síntesis de la hebra líder en la horquilla de replicación. Esta enzima está formada por dos subunidades, y la mayor de ellas contiene el sitio activo de polimerasa. La enzima también tiene actividad de exonucleasa $3' \longrightarrow 5'$. La replicación de ADN en las células eucarióticas es extremadamente exacta. La baja tasa de errores parece indicar que la replicación de ADN en los eucariotas incluye un paso eficiente de corrección.

La ADN polimerasa α y la ADN polimerasa δ cooperan en la síntesis de la hebra retrasada. La ADN polimerasa α es una proteína multimérica que contiene actividad tanto de ADN polimerasa como de ARN primasa. El cebador preparado por la ADN polimerasa α consiste en un tramo corto de ARN seguido por ADN. Este cebador de dos partes es prolongado por la ADN polimerasa δ, para completar un fragmento de Okazaki.

La ADN polimerasa ε es una proteína grande y multimérica. La cadena mayor de polipéptido contiene actividad de polimerasa y actividad de exonucleasa de corrección

TABLA 20.2 ADN polimerasas eucarióticas

ADN polimerasa	Actividades	Papel
α	Polimerasa Primasa Exonucleasa $3' \rightarrow 5'$[a]	Síntesis de cebador Reparación
β	Polimerasa	Reparación
γ	Polimerasa Exonucleasa $3' \rightarrow 5'$	Replicación de ADN mitocondrial
δ	Polimerasa Exonucleasa $3' \rightarrow 5'$	Síntesis de hebra líder y retrasada Reparación
ε	Polimerasa Exonucleasa $3' \rightarrow 5'$ Exonucleasa $5' \rightarrow 3'$	Reparación Llenado de hueco en hebra retrasada

[a]La actividad de la polimerasa α $3' \rightarrow 5'$ no es detectable en todas las especies.

$3' \rightarrow 5'$. Como su contraparte funcional en *E. coli* (ADN polimerasa I), es probable que la ADN polimerasa ε actúe como enzima de reparación, y también que llene huecos entre fragmentos de Okazaki.

Hay varias proteínas accesorias asociadas a la horquilla de replicación en los eucariotas. Esas proteínas funcionan como algunas de las que hay en el replisoma bacteriano. Por ejemplo, el PCNA (*proliferating cell nuclear antigen;* antígeno nuclear de proliferación celular) forma una estructura que se parece a la subunidad β de abrazadera deslizante en la ADN polimerasa III de *E. coli* (figura 20.7). La proteína accesoria RPC (*replication factor C*, factor C de replicación) se relaciona estructural, funcional y evolutivamente con el complejo γ de la ADN polimerasa III. Otra proteína, llamada RPA (factor de replicación A) es el equivalente eucariótico de la SSB procariótica. Además, la máquina eucariótica de replicación contiene helicasas que destuercen al ADN en la horquilla de replicación.

Como se describió en la sección 20.1, cada cromosoma eucariótico contiene muchos orígenes de replicación. Por ejemplo, el cromosoma más grande de la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster,* contiene unas 6 000 horquillas de replicación, lo que implica que al menos haya 3 000 orígenes. Al avanzar la replicación en forma bidireccional a partir de cada origen, las horquillas se acercan entre sí y se funden para formar burbujas de tamaño siempre creciente (figura 20.4). A causa de la gran cantidad de orígenes, los cromosomas más grandes de los eucariotas se pueden replicar también en menos de una hora, aun cuando la velocidad del movimiento individual de horquillas sea mucho menor que en los procariotas.

La replicación de ADN en las células eucarióticas se hace en el contexto del ciclo programado de división de la célula. Este ciclo celular es una progresión muy regulada que pasa por una serie de pasos dependientes que como mínimo tiene dos metas: 1) duplicar fielmente todo el ADN en una célula para producir dos copias exactas de cada cromosoma y 2) segregar con precisión una copia de cada cromosoma replicado y mandarla a una de las dos células hijas. El primer paso, cuando se replica o sintetiza el ADN, se llama fase S, en tanto que el segundo paso, cuando se segregan los cromosomas durante la mitosis, se llama fase M (véase la figura 20.18, página 634). Por consiguiente, los orígenes de replicación eucariótica de ADN deben usarse una vez y sólo una vez durante la fase S de cada ciclo celular. Se está empezando a comprender algunos de los aspectos clave que componen este proceso. Al final de la fase M anterior, y durante la siguiente fase G1, cada origen funcional se convierte en un sitio de ensamble para un complejo multiproteínico conservado llamado ORC (complejo de reconocimiento de origen, *origin recognition complex*). Cuando la célula avanza por G1, cada ORC estimula la formación de un complejo de pre-replicación (pre-RC) que consiste en reunir las proteínas esenciales, Cdc6 y Cdt1, igual que la helicasa MCM de seis subunidades. El pre-RC permanece anclado hasta que la actividad de una proteína cinasa de fase S (SPK) llega a un umbral crítico, donde el complejo de iniciación reúne a los re-

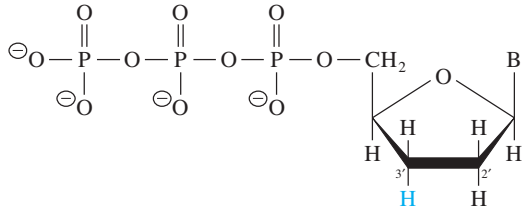
RECUADRO 20.1 Secuenciación del ADN con dideoxinucleótidos

En 1976, Frederick Sanger inventó un método para secuenciar ADN enzimáticamente, usando el fragmento Klenow de *E. coli* ADN polimerasa I. Por este logro recibió el segundo Premio Nobel (el primero lo recibió por inventar un método para secuenciar proteínas). La ventaja de usar el fragmento de Klenow para esta clase de reacción es que la enzima no tiene actividad de exonucleasa $5' \rightarrow 3'$, que podría degradar el ADN recién sintetizado. Sin embargo, una de las desventajas es que el fragmento Klenow no es muy procesivo, y se inhibe con facilidad por la presencia de la estructura secundaria en la plantilla de ADN de una hebra. Se puede superar esta limitación agregando SSB o proteínas análogas, o con más frecuencia, usando ADN polimerasas de bacterias que crecen a altas temperaturas. Esas polimerasas son activas entre 60 y 70 °C, temperatura a la que la estructura secundaria en el ADN de una hebra es inestable.

El método de secuenciación de Sanger usa 2′,3′-didesoxinucleósido trifosfatos (ddNTP), que difieren de los sustratos de desoxirribonucleótidos en la síntesis del ADN porque carecen de un grupo 3′-hidroxilo (véase abajo). Los didesoxirribonucleótidos, que pueden servir como sustratos para ADN polimerasa, se agregan al extremo 3′ de la cadena en crecimiento. Como esos nucleótidos no tienen grupo 3′-hidroxilo, no pueden efectuarse más adiciones de nucleótido, y la incorporación de un didesoxinucleótido termina el crecimiento de la cadena de ADN. Cuando se incluye una pequeña cantidad de determinado didesoxirribonucleótido en la reacción de síntesis de ADN, a veces se incorpora en lugar del dNTP correspondiente y termina de inmediato la replicación. La longitud del fragmento resultante de ADN identifica la posición del nucleótido que se debería haber incorporado.

La secuenciación de ADN usando moléculas de ddNTP consiste en varios pasos (como se ve en la siguiente página). El ADN se prepara como moléculas de una hebra y se mezcla con un oligonucleótido corto, complementario al extremo 3′ del ADN que se va a secuenciar. Este oligonucleótido actúa como cebador para la síntesis de ADN catalizada por ADN polimerasa. El material cebado con oligonucleótido se divide en cuatro tubos de reacción separados. Cada tubo recibe una pequeña cantidad de un dNTP marcado con α-[^{32}P], cuya radiactividad permite visualizar el ADN recién sintetizado por autorradiografía. A continuación, cada tubo recibe un exceso de las cuatro moléculas no radiactivas de dNTP, y una pequeña cantidad de uno de los cuatro ddNTP. Por ejemplo, el tubo de reacción A recibe un exceso de dTTP, dGTP, dCTP y dATP no radiactivos, mezclados con una pequeña cantidad de ddATP. A continuación se agrega a la mezcla de reacción ADN polimerasa. A medida que la polimerasa va replicando el ADN, a veces incorpora un residuo de ddATP en lugar de uno de dATP, y termina la síntesis del ADN en crecimiento. La incorporación aleatoria de ddATP da como resultado la producción de fragmentos de ADN recién sintetizados de diversas longitudes, y cada uno termina en A (es decir, ddA). La longitud de cada fragmento corresponde a la distancia desde el extremo 5′ del cebador, a uno de los residuos de adenina en la secuencia. Si se agrega un distinto didesoxirribonucleótido a cada tubo de reacción se produce un conjunto distinto de fragmentos: ddTTP produce fragmentos que terminan con T, ddGTP con G y ddCTP con C. Las cadenas recién sintetizadas de cada reacción de secuenciación se separan de la plantilla de ADN. Por último, las mezclas de cada reacción de secuenciación se someten a electroforesis en bandas adyacentes sobre un gel de secuenciación, donde los fragmentos se separan por tamaños. Entonces se puede leer la secuencia de la molécula de ADN en una autorradiografía del gel.

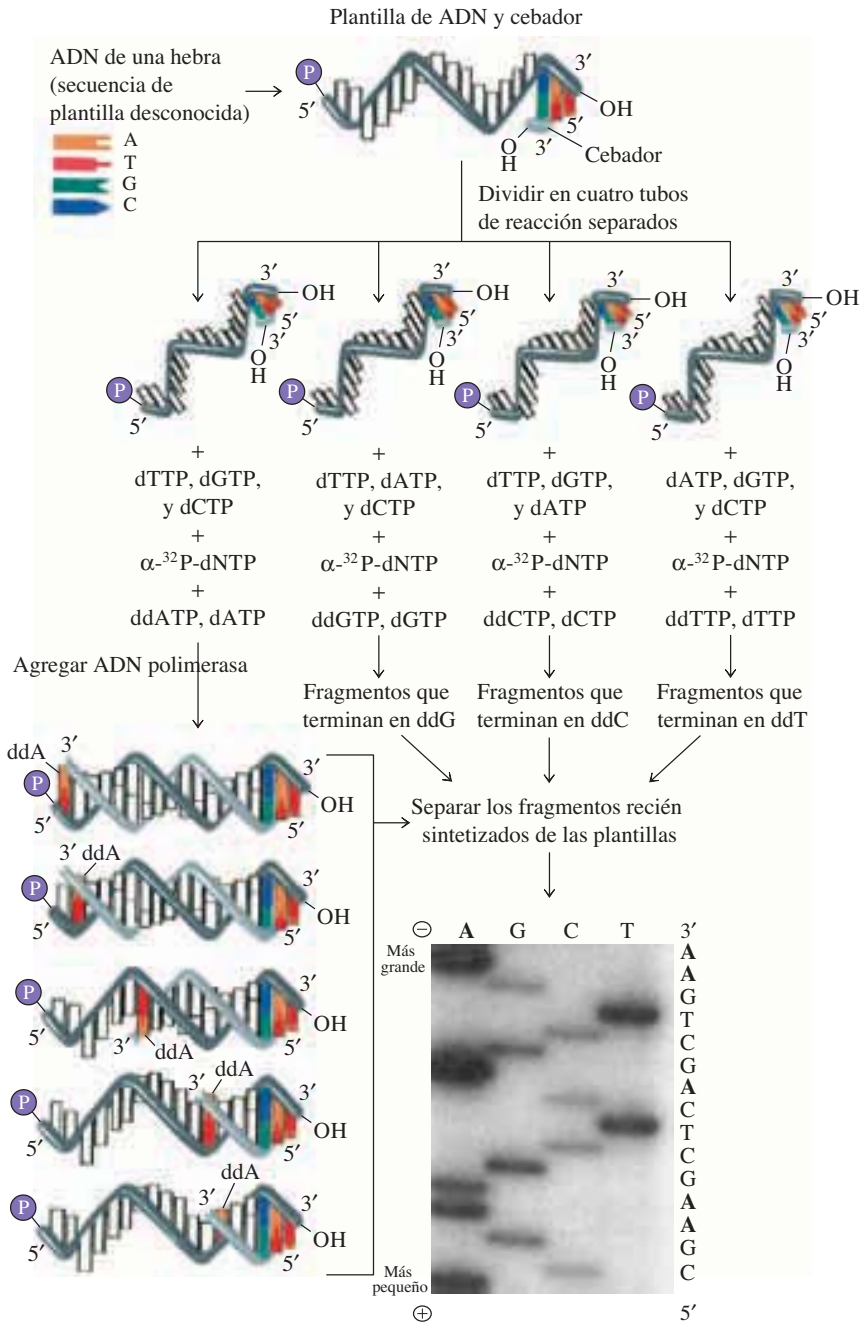
Esta técnica también se ha modificado para permitir la automatización para aplicaciones de alta producción, como secuenciación genómica. En vez de usar la radiactividad, la secuenciación automática se basa en desoxinucleótidos marcados fluorescentemente (cuatro colores, uno para cada base) para detectar las distintas longitudes de cadena. En este sistema, un fluorímetro "lee" el gel y los datos se guardan en un archivo de computadora. Además, la máquina secuenciadora también puede producir un cromatograma gráfico que muestre la ubicación y el tamaño de cada pico fluorescente en el gel, a medida que pasa por el detector.



▲ Estructura química de un 2′,3′-didesoxinucleósido trifosfato. *B* representa cualquier base.

plisomas en espera, y se dice que se "dispara" el origen, lo que significa que las dos horquillas de replicación se lanzan a lo largo del cromosoma, en direcciones opuestas. Cuando es alta la actividad SPK, evita que se cargue alguna pre-RC nueva en los orígenes, lo cual inhibe varias rondas de iniciación. Después de la fase S y la G2, la SPK se rompe proteolíticamente y con eso permite la unión de ORC a los orígenes en espera en cada cromosoma hijo.

Las diferencias entre la replicación eucariótica y procariótica de ADN no sólo se deben al tamaño mayor del genoma eucariótico, sino también al empacamiento del ADN



◀ Método Sanger para secuenciar ADN. La adición de una pequeña cantidad de determinado didesoxinucleósido trifosfato (ddNTP) a cada mezcla de reacción hace que termine la síntesis de ADN cuando ese didesoxinucleótido se incorpora en lugar del nucleótido normal. Las posiciones de los didesoxinucleótidos incorporados, determinadas por las longitudes de los fragmentos de ADN, indican las posiciones del nucleótido correspondiente en la secuencia. Los fragmentos generados durante la síntesis con cada ddNTP se separan por tamaño usando un gel de secuenciación electroforética, y la secuencia del ADN se puede leer por una autorradiografía del gel (como se ve en la columna de letras a la derecha del gel). (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

eucariótico en la cromatina. La unión de ADN a las histonas y su empacamiento en nucleosomas, como se describió en la sección 19.5A, parece que es en parte la causa del movimiento más lento de la horquilla de replicación en los eucariotas. La replicación de ADN eucariótico sucede con la síntesis concomitante de histonas; la cantidad de histonas se duplica con cada ronda de replicación de ADN. La duplicación de histonas y la replicación de ADN implican enzimas distintas que actúan en diferentes partes de la célula, pero ambas suceden aproximadamente con la misma rapidez. Al parecer, las histonas existentes permanecen unidas al ADN durante la replicación, y las histonas recién sintetizadas se unen al ADN detrás de la horquilla de replicación, poco después de la síntesis de las hebras nuevas.

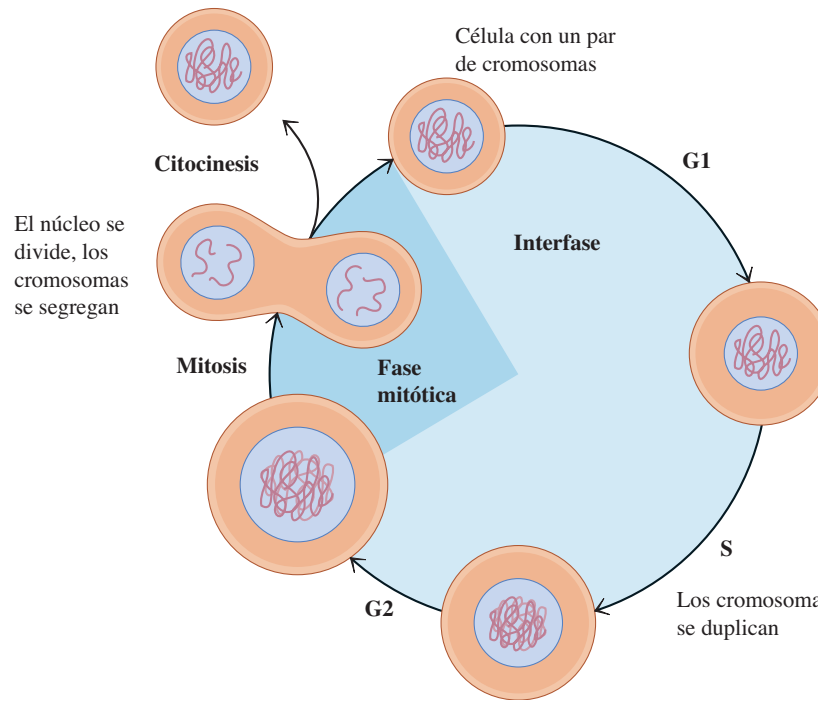


Figura 20.18 ▶
El ciclo de división celular eucariótica coordina la replicación de ADN con la mitosis. La replicación de ADN sucede exclusivamente durante la síntesis, o fase S, del ciclo celular. Hay dos huecos, o fases G, donde una célula crece antes de dividirse en la mitosis, o fase M.

20.7 Reparación de ADN dañado

El ADN es la única macromolécula celular que se puede reparar, quizá debido a que el costo del organismo mutado o el ADN dañado supera con mucho a la energía dedicada a reparar el defecto. La reparación de otras macromoléculas no es rentable. Por ejemplo, se pierde poco cuando se forma una proteína defectuosa como resultado de un error de traducción. La proteína simplemente se sustituye por una nueva y funcional. Sin embargo, cuando se daña el ADN, todo el organismo está amenazado, si se alteran las instrucciones para sintetizar una molécula crítica. En los organismos unicelulares, el daño a un gen que codifique una proteína esencial puede matar al organismo. Aun en los organismos multicelulares, la acumulación de defectos en el ADN al paso del tiempo puede causar pérdida progresiva de funciones celulares, o crecimiento no regulado, como el que se ve en las células cancerosas.

El daño del ADN tiene diversas formas que incluyen modificaciones en las bases, omisiones o inserciones de nucleótidos, enlaces cruzados de hebras de ADN y ruptura del esqueleto de fosfodiéster. Mientras que algo del daño al ADN es resultado de agentes ambientales, como sustancias químicas o radiaciones, otros daños al ADN se deben a errores ocurridos en los procesos celulares normales; por ejemplo, la incorporación de un nucleótido incorrecto durante la replicación del ADN. Un daño grave puede ser letal, pero gran parte de los daños que se presentan *in vivo* se reparan. Muchos nucleótidos modificados, igual que bases mal apareadas que escapan al mecanismo de corrección de la ADN polimerasa, son reconocidos por enzimas específicas de reparación que recorren continuamente al ADN para detectar alteraciones. Algunas lesiones se arreglan por **reparación directa**, proceso que no requiere romper el esqueleto de fosfodiéster del ADN. Otras reparaciones requieren procesos más extensos.

Los mecanismos de reparación de ADN protegen a las células individuales, y también a las generaciones siguientes. En organismos unicelulares, sean procariotas o eucariotas, el daño al ADN que no se repara puede convertirse en mutación que pasa en forma directa a las células hijas después de la replicación del ADN y la división celular. En los organismos multicelulares, las mutaciones pueden pasar a la siguiente generación sólo si se presentan en la línea germinal. Puede ser que las mutaciones de línea germinal no tengan efectos observables en el organismo que las contiene, pero pueden

tener efectos profundos en la progenie, en especial si los genes mutados son importantes en el desarrollo. Sin embargo, cuando se presentan mutaciones en las células somáticas, si bien los defectos no son transmisibles, a veces pueden causar crecimiento celular irrestricto, o cáncer. No obstante la exactitud de replicación del ADN y la eficiencia de reparación, el humano promedio acumula unas diez nuevas mutaciones cada generación. Es esta variación la que hace posible la identificación de los individuos mediante dactiloscopia de su ADN.

A. Reparación después de fotodimerización: ejemplo de reparación directa

El ADN doble helicoidal es especialmente susceptible a daños por luz ultravioleta (UV). El daño más común inducido por ADN es la dimerización de pirimidinas adyacentes en una hebra de ADN. Este proceso es un ejemplo de fotodimerización. Los dímeros más comunes se forman entre timinas adyacentes (figura 20.19). No puede haber replicación de ADN en presencia de dímeros de pirimidina, tal vez porque distorsionan la hebra de plantilla. En consecuencia, para la supervivencia es esencial la eliminación de dímeros de pirimidina.

Muchos organismos pueden reparar el daño por dímero de timina usando reparación directa (en forma notable, los humanos y todos los mamíferos placentarios carecen de este mecanismo de reparación; véase más adelante). El proceso de reparación más simple es la fotorreactivación, donde una enzima llamada ADN fotoliasa se une a la doble hélice distorsionada en el sitio del dímero de timina (figura 20.20, página siguiente). Cuando el complejo ADN-enzima absorbe luz visible, se invierte la reacción de dimerización. Entonces, la fotoliasa se disocia del ADN reparado y se vuelven a formar los pares normales de bases A/T. La fotorreactivación es un ejemplo de reparación directa.

B. Reparación por escisión

Hay otras formas en que la radiación ionizante y las sustancias naturales pueden dañar al ADN. Algunos compuestos, como ácidos y agentes oxidantes pueden modificar al ADN por alquilación, metilación o desaminación. El ADN es susceptible también a la pérdida espontánea de bases heterocíclicas, proceso llamado despurinación o despirimidización.

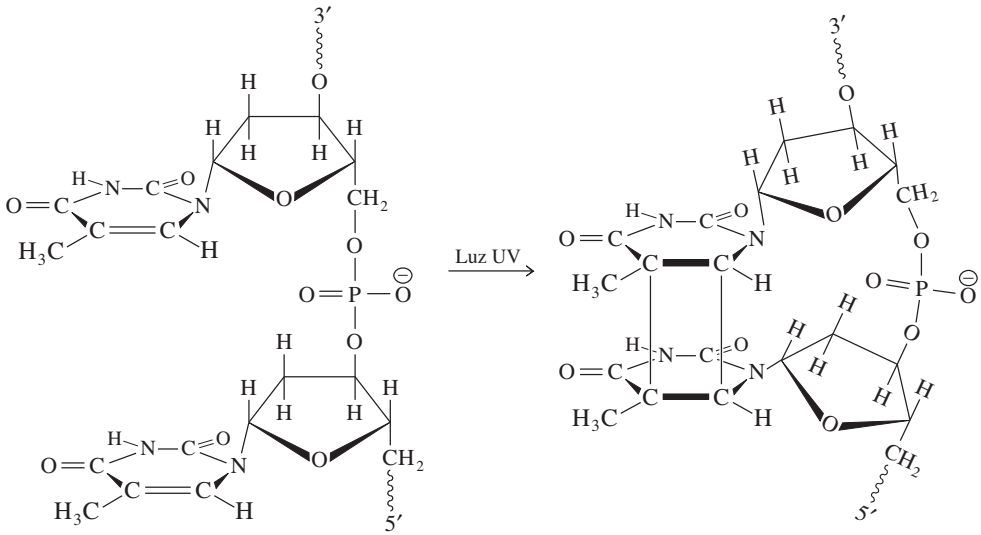


Figura 20.19 ▲
Fotodimerización de residuos adyacentes de desoxitimidilato. La luz ultravioleta hace que las bases se dimericen y distorsionen la estructura del ADN. Para mayor claridad sólo se muestra una hebra del ADN.

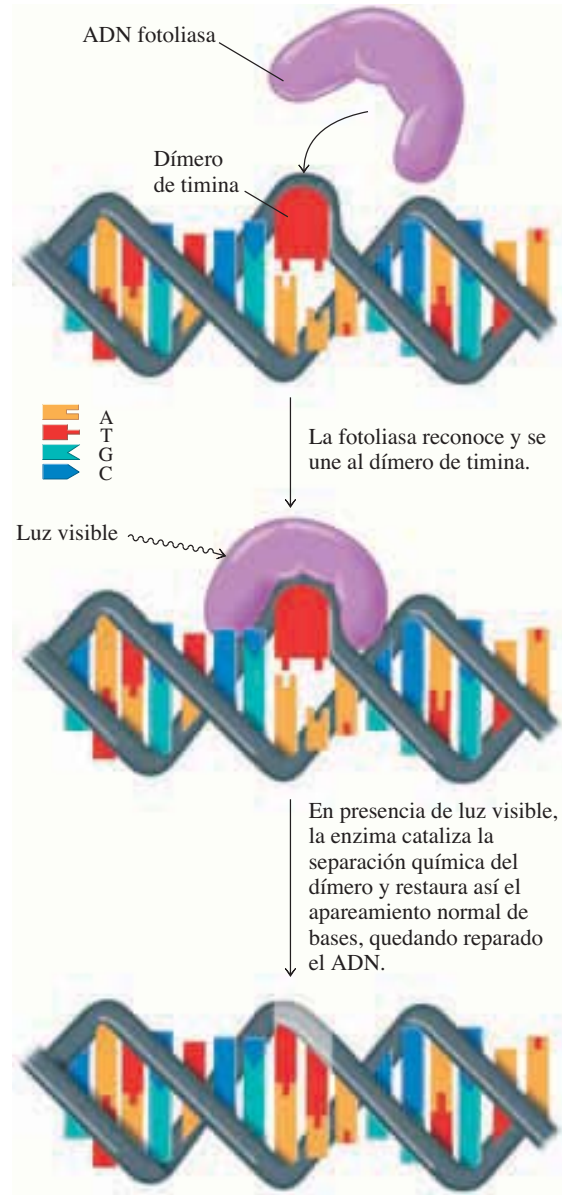
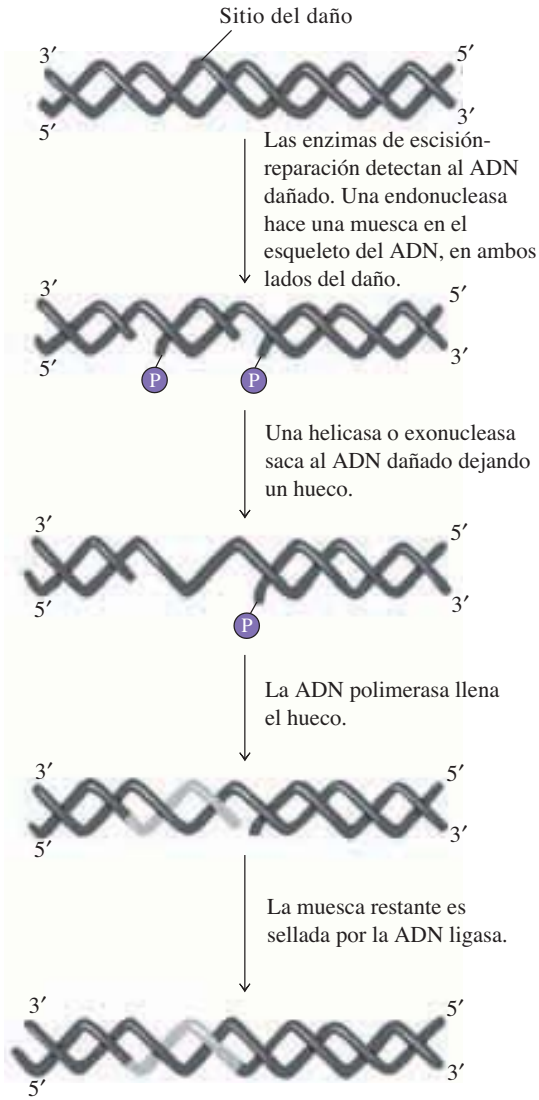


Figura 20.20 ▶
Reparación de dímeros de timina por ADN fotoliasa. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

Muchos de esos defectos se pueden reparar a través de una **ruta general de reparación por escisión** cuyas características generales son parecidas en todos los organismos. En el primer paso de la ruta de reparación, una endonucleasa reconoce al ADN distorsionado y dañado, y lo rompe en ambos lados de la lesión, liberando un oligonucleótido con 12 o 13 residuos. En *E. coli*, la ruptura está catalizada por la enzima UvrABC. La eliminación del oligonucleótido del ADN podrá necesitar actividad de helicasa, que con frecuencia es un componente del complejo enzimático de escisión-reparación. El resultado es un hueco en una hebra. En el segundo paso de la ruta, el hueco se llena por la acción de ADN polimerasa I en los procariotas, o por ADN polimerasas de reparación en los eucariotas. A continuación la ADN ligasa sella a la muesca (figura 20.21).

La endonucleasa UvrABC también reconoce a dímeros de pirimidina y a bases modificadas que distorsionan la doble hélice (es la forma en que se reparan los dímeros de timina en los humanos). Otras enzimas de reparación por escisión reconocen al ADN dañado por desaminación hidrolítica de la adenina, citosina o guanina. (Como la timina no tiene grupo amino, no está sujeta a desaminación). La desaminación espontánea de la citocina es uno de los daños más comunes al ADN (figura 20.22). Las bases desaminadas



◀Figura 20.21
Ruta general de escisión-reparación. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

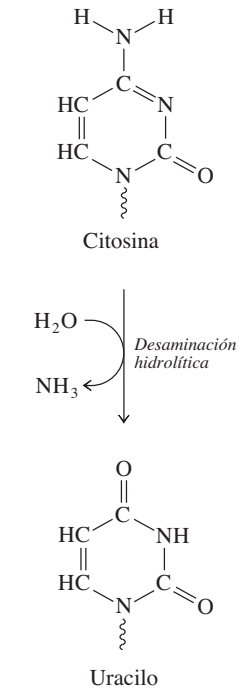


Figura 20.22 ▲
Desaminación hidrolítica de la citosina. Esta desaminación produce uracilo, que se aparea con adenina y no con guanina.

pueden formar pares incorrectos de bases y, si no se eliminan y reemplazan, causan la incorporación de bases incorrectas durante la siguiente ronda de replicación.

Unas enzimas llamadas ADN glicosilasas eliminan a las bases desaminadas, y a otras bases modificadas, catalizando la hidrólisis de los enlaces *N*-glicosídicos que unen las bases modificadas con los azúcares. En el caso de la citosina desaminada, la enzima uracilo *N*-glicosilasa elimina al uracilo producido por desaminación. La enzima reconoce al par incorrecto de bases U/G y se une con él, y voltea hacia afuera la base uracilo, colocando el enlace β-*N*-glicosídico en el sitio activo de la enzima (figura 20.23). A continuación, una endonucleasa reconoce el sitio en el cual la base está ausente, y saca el fosfato de desoxirribosa, dejando un hueco de un nucleótido en el ADN dúplex. Ya que la endonucleasa reconoce los sitios apurínicos y apirimidínicos (sitios AP), se llama AP-endonucleasa, o endonucleasa AP. Algunas ADN glicosilasas específicas son enzimas bifuncionales con actividad tanto de glicosilasa como de AP-endonucleasa, en la misma cadena de polipéptido. Las enzimas de reparación por escisión con actividad de exonucleasa amplían con frecuencia el hueco producido por la endonucleasa. En los procariotas, la ADN polimerasa I se une al extremo expuesto 3′ del ADN y rellena el hueco. Por último, la hebra se sella mediante ADN ligasa. Los pasos de la ruta de reparación por escisión se resumen en la figura 20.24.

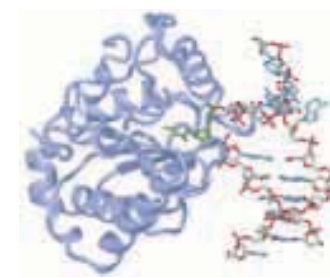


Figura 20.23 ▲
Uracilo *N*-glicosilasa, de mitocondrias humanas. La enzima se une a un nucleótido que contenga uracilo (en verde) que se haya desprendido de la región apilada en el ADN de doble hebra. [PDB 1EMH]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

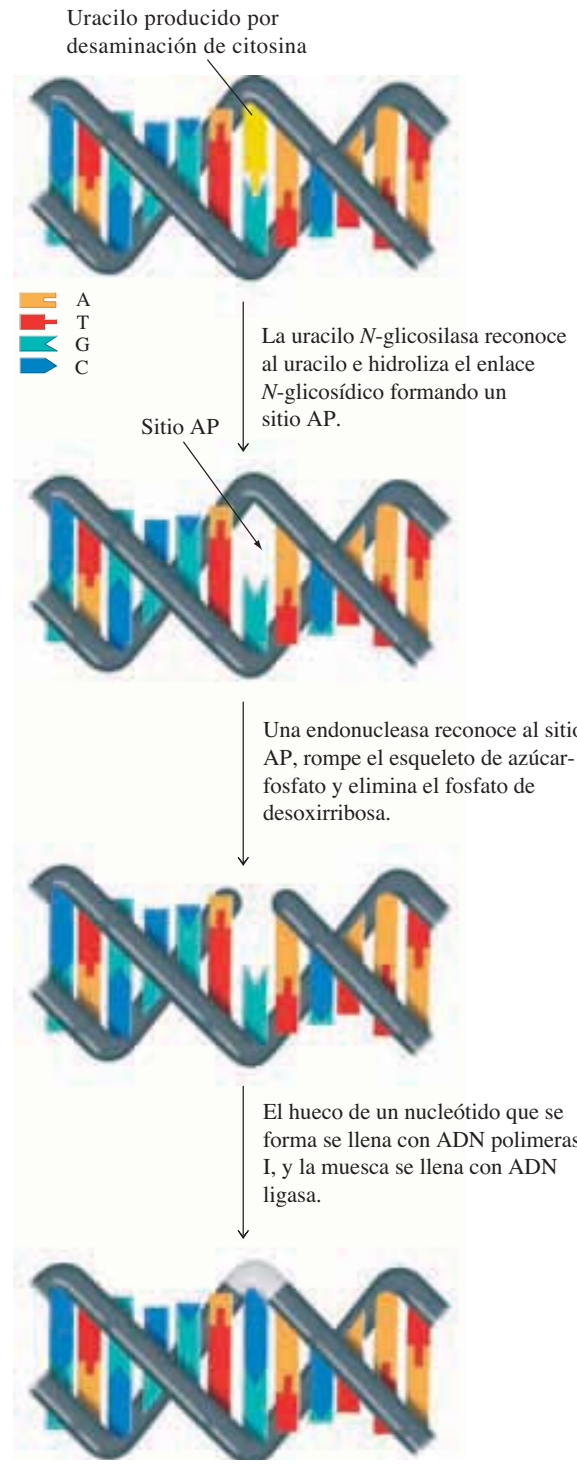


Figura 20.24 ▶
Reparación del daño causado por desaminación de citosina. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

Si bien es rara la desaminación de adenina o de guanina, la de la citosina es bastante común, y podría originar grandes cantidades de mutaciones, si no fuera por el reemplazo del uracilo con timina en el ADN. (Recuérdese que la timina sólo es 5-metiluracilo). Si se encontrara uracilo normalmente en el ADN, como lo es en el ARN, sería imposible distinguir entre un residuo correcto de uridilato y uno proveniente de la desaminación de citosina. Sin embargo, como el uracilo no es una de las bases en el ADN, se pueden reconocer

y reparar los daños debidos a desaminación de citosina. Así, la presencia de timina en el ADN aumenta la estabilidad de la información genética.

20.8 Recombinación homóloga

Recombinación es cualquier evento que cause el intercambio o transferencia de trozos de ADN de un cromosoma a otro, o dentro de un cromosoma. La mayor parte de las recombinaciones son ejemplos de **recombinación homóloga**; suceden entre piezas de ADN que tienen secuencias estrechamente relacionadas. Los intercambios entre cromosomas apareados durante la meiosis son ejemplos de recombinación homóloga. La recombinación entre secuencias no relacionadas se llama recombinación no homóloga. Los transposones, que son elementos genéticos móviles, saltan de cromosoma a cromosoma aprovechando mecanismos de recombinación no homóloga. La recombinación entre moléculas de ADN también se presenta cuando se integran bacteriófagos a los cromosomas huéspedes. Cuando hay recombinación en un lugar específico, se llama recombinación específica del sitio.

La mutación crea nueva variación genética en una población. La recombinación es un mecanismo que crea distintas combinaciones, o permutaciones, de mutaciones en un genoma. La mayoría de las especies cuenta con algún mecanismo para intercambiar información entre organismos individuales. En general, los procariotas contienen sólo una copia de su genoma (es decir, son haploides), por lo que para ese intercambio se requiere recombinación. También algunos eucariotas son haploides, pero la mayoría son diploides, y cada progenitor aporta uno de los dos conjuntos de cromosomas. En la recombinación genética en los diploides se mezclan los genes en los cromosomas aportados por cada padre, de tal modo que las generaciones siguientes reciben combinaciones muy diferentes de genes. Por ejemplo, ninguno de los cromosomas de los hijos será igual a los de sus padres, y ninguno de los de los padres son iguales a los de los padres de los padres. (Aunque esta mezcla de alelos es una consecuencia importante de la recombinación, no es probable que sea la primera causa por la que evolucionaron los mecanismos de recombinación).

La recombinación se efectúa mediante muchos mecanismos distintos. Gran parte de las proteínas y enzimas que participan en las reacciones de recombinación también intervienen en las reacciones de reparación de ADN, lo que ilustra la estrecha relación entre reparación y recombinación. En esta sección se describirá en forma breve el modelo Holliday de recombinación general, tipo de recombinación que parece suceder en muchas especies.

A. Modelo Holliday de recombinación general

La recombinación homóloga comienza con la introducción de rupturas de una o dos hebras en moléculas de ADN. La recombinación con roturas de una hebra se llama con frecuencia recombinación general; la recombinación en que participan roturas de doble hebra no se describirá aquí, aunque es un mecanismo importante de recombinación en algunas especies.

Como ejemplo de recombinación en procariotas, veamos la recombinación general entre dos cromosomas lineales. El intercambio de información entre las moléculas comienza con el alineamiento de las secuencias homólogas de ADN. A continuación se introducen muescas de una hebra en las regiones homólogas, y se intercambian hebras únicas en un proceso llamado invasión de hebra. La estructura que resulta contiene una región de cruce de hebras, y se llama acoplamiento de Holliday, por Robin Holliday que lo propuso por primera vez en 1964 (figura 20.25, página siguiente).

En esta etapa se pueden separar los cromosomas rompiendo las dos hebras invasoras en el punto de cruce. Sin embargo, es importante darse cuenta que los extremos de las moléculas homólogas de ADN pueden girar, y generar conformaciones diferentes del acoplamiento de Holliday. Como se ve en la figura 20.25, la rotación, seguida por la escisión, produce dos cromosomas que tienen extremos intercambiados. Es probable

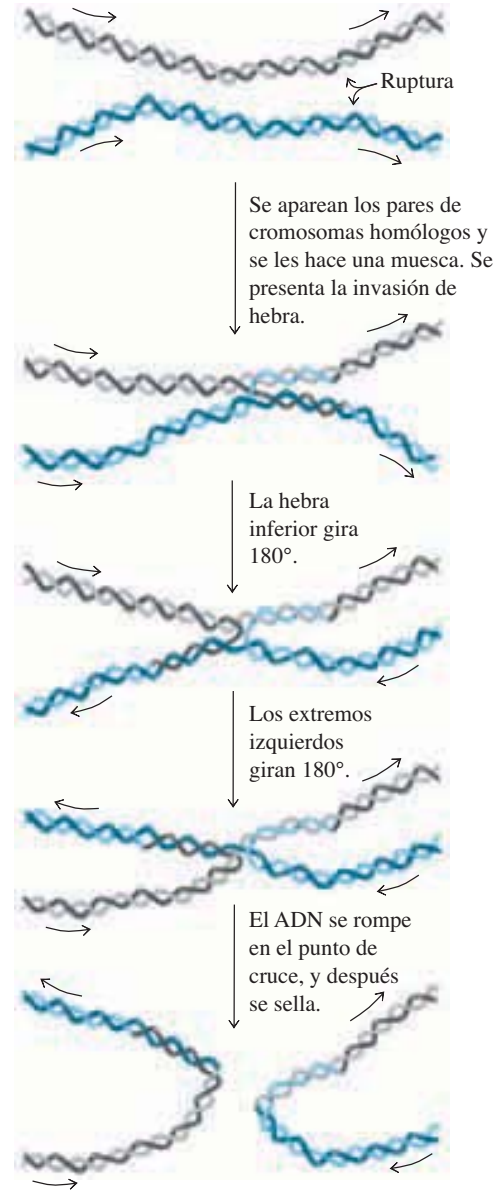


Figura 20.25 ▶
Modelo Holliday de la recombinación general. Primero se introducen muescas en una región homóloga de cada molécula. Por posterior invasión de hebra, ruptura de ADN en la unión de cruce, y sellado de las hebras con muesca se produce el intercambio de los extremos de los cromosomas. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

que la recombinación en muchos organismos diferentes suceda con un mecanismo parecido al que muestra la figura 20.25.

B. Recombinación en *E. coli*

Uno de los primeros pasos en la recombinación es la generación de ADN de una hebra, con un extremo libre 3′. En *E. coli* este paso lo efectúa la RecBCD endonucleasa, enzima con subunidades codificadas por tres genes (*rec*B, *rec*C y *rec*D), que desde hace mucho tiempo se sabe que sus productos tienen un papel en la recombinación. La RecBCD se une al ADN y rompe una de las cadenas. A continuación destuerce el ADN en un proceso acoplado a la hidrólisis de ATP, generando un ADN de una hebra con un término 3′.

El intercambio de hebras durante la recombinación comienza cuando el ADN de una hebra invade la doble hélice de una molécula vecina de ADN. El intercambio de hebras no es un evento favorable desde el punto de vista termodinámico, y la invasión

debe ayudarse con proteínas que promuevan la recombinación y la reparación. La RecA es la proteína prototipo de intercambio de hebra. Es esencial para la recombinación homóloga, y para algunas formas de reparación. La proteína funciona como monómero que se une en forma cooperativa al ADN de una hebra, por ejemplo las colas de una hebra producidas por la acción de la RecBCD. Cada monómero de RecA cubre unos cinco residuos de nucleótido, y cada monómero sucesivo se une al lado contrario de la hebra de ADN.

Una de las funciones clave de la RecA en la recombinación es reconocer regiones de semejanza de secuencia. La RecA promueve la formación de un intermedio de triple hebra, entre la hebra única recubierta por RecA y una región muy parecida del ADN de doble hebra. Entonces, la RecA cataliza el intercambio de hebra, donde la hebra única desplaza a la hebra correspondiente de la doble hélice.

El intercambio de hebras se hace en dos pasos: invasión de hebra seguida por migración de rama (figura 20.26). Durante la reacción de intercambio, tanto el ADN de una hebra como el de dos hebras tienen la conformación extendida. Las hebras deben girar una en torno a la otra, proceso que probablemente sea ayudado por topoisomerasas. El intercambio de hebras es un proceso lento, a pesar de que no se rompen enlaces covalentes. (Un proceso "lento" en bioquímica es uno que tarda varios minutos).

La RecA también puede promover invasión de hebra entre dos moléculas de ADN alineadas de doble hebra. Las dos moléculas deben contener colas de una hebra unidas a RecA. Las colas se enrollan en torno a las hebras complementarias correspondientes en el homólogo. Este intercambio origina un acoplamiento de Holliday como el de la figura 20.25. La migración de rama que sigue puede ampliar la región de intercambio de hebra. La migración de rama puede continuar, aun después de que se disocie la RecA del intermedio de recombinación.

La migración de rama en la versión de doble hebra, de un acoplamiento de Holliday, es impulsada por una notable máquina de proteína que se encuentra en todas las especies. La versión bacteriana está formada por subunidades RuvA y RuvB. Estas proteínas se unen con el acoplamiento y promueven la migración de rama, como se ve en el esquema (figura 20.27, página siguiente). Las dos hélices del ADN se separan cuando RuvC se une al acoplamiento de Holliday y rompe las hebras de cruce.

RuvA y RuvB forman un complejo formado por cuatro subunidades RuvA unidas al acoplamiento Holliday, y dos anillos hexaméricos de subunidades RuvB que rodean a dos de las hebras de ADN (figura 20.28, página siguiente). El componente RuvB se parece a las abrazaderas de anillo deslizante descritas en la sección sobre replicación de ADN (sección 20.2B). Esto impulsa la migración de rama tirando de las hebras a través del complejo RuvA/acoplamiento de Holliday, en una reacción acoplada con hidrólisis de ATP (figura 20.29, página 643). La velocidad de la migración de rama mediada por RuvAB es aproximadamente de 100 000 pares de bases por segundo, bastante mayor que la invasión de hebra.

La RuvC cataliza la escisión de las hebras de cruce para separar los acoplamientos de Holliday. Se producen dos tipos de moléculas recombinantes como resultado de esta ruptura: las que sólo tienen intercambiadas hebras únicas, y aquellas donde se intercambian los extremos del cromosoma (figura 20.25).

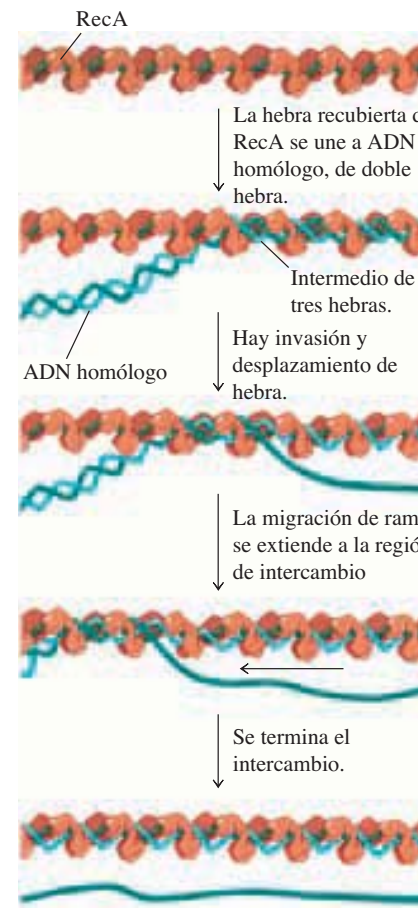


Figura 20.26 ▲
Intercambio de hebras catalizado por RecA. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

C. La recombinación puede ser una forma de reparación

Como la selección natural funciona principalmente a nivel de organismos individuales, es difícil ver por qué habría evolucionado la recombinación, a menos que afectara la supervivencia del individuo. Es probable que las enzimas de recombinación evolucionaran porque tienen un papel en la reparación de ADN, que confiere una ventaja de selección. Por ejemplo, las lesiones graves de ADN se ignoran durante la replicación del mismo, dejando una hebra hija con una región de una sola hebra. El intercambio de hebra mediado por RecA, entre cromosomas hijos homólogos, permite que la hebra intacta de una molécula hija sea una plantilla para reparar la hebra rota de la otra molécula hija.

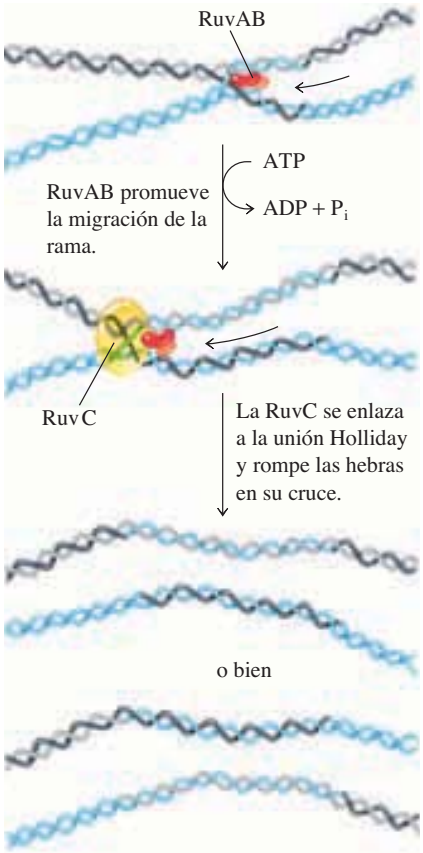


Figura 20.27 ▲
Acción de proteínas Ruv en uniones Holliday. La RuvAB promueve la migración de la rama en una reacción que requiere hidrólisis de ATP. La RuvC rompe las uniones Holliday. Se pueden generar dos tipos de moléculas recombinantes en esta reacción. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

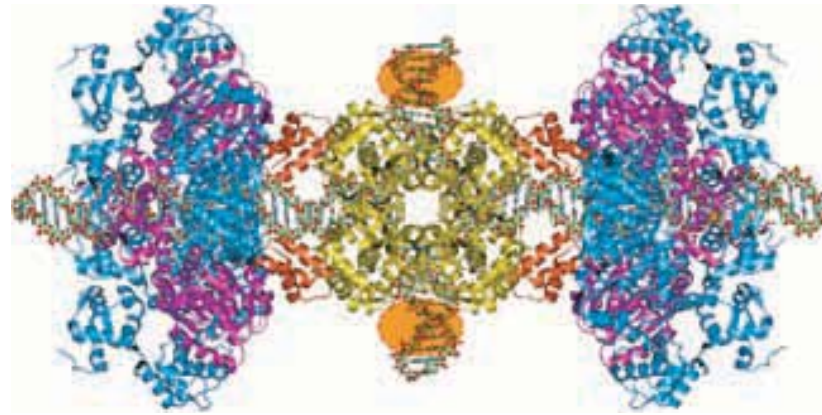


Figura 20.28 ▲
Modelo de RuvA y RuvB enlazadas a una unión de Holliday. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

La recombinación también crea nuevas combinaciones de genes en un cromosoma, ventaja adicional para la población y sus probabilidades de supervivencia evolutiva. Se requieren más de 100 genes de *E. coli* para recombinación y reparación.

La mayor parte, si no es que todos los genes usados en la recombinación, también tienen algún papel en la reparación. No se conoce la cantidad de genes necesarios para reparaciones y recombinaciones en los eucariotas, pero muchos de los que ya se descubrieron se relacionan con genes bacterianos. Las mutaciones en varios genes humanos originan defectos genéticos raros causados por deficiencias en la reparación, recombinación de ADN, o ambos aspectos. Por ejemplo, el xerodermia pigmentosa es una enfermedad hereditaria relacionada con sensibilidad extrema a la luz ultravioleta, y con mayor frecuencia de cáncer de la piel. La reparación por escisión es defectuosa en los pacientes con esta enfermedad, pero el fenotipo puede deberse a mutaciones en al menos ocho genes diferentes. Uno de esos genes codifica una ADN glicosilasa con actividad de endonucleasa AP. Otros genes afectados son algunos que codifican las helicasas que se requieren tanto para reparación como para recombinación.

No se han caracterizado bien muchos otros defectos genéticos relacionados con deficiencias en reparación y recombinación. Algunos de ellos son la causa de mayores incidencias de cáncer en los pacientes afectados. Ahora que se conoce la secuencia del genoma humano, no pasará mucho tiempo para que se comprenda el papel de esos genes. Eso podría conducir a tratamientos eficaces de pacientes que padecen esas enfermedades.

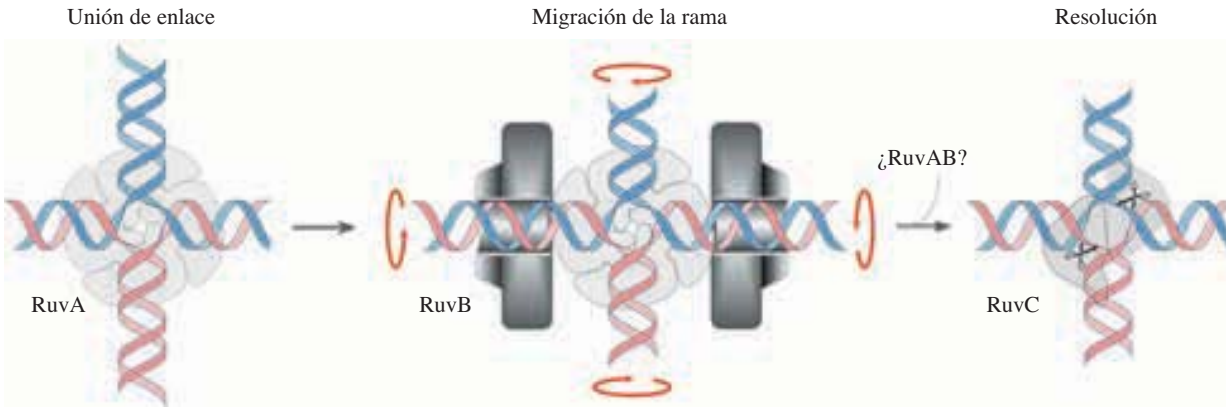
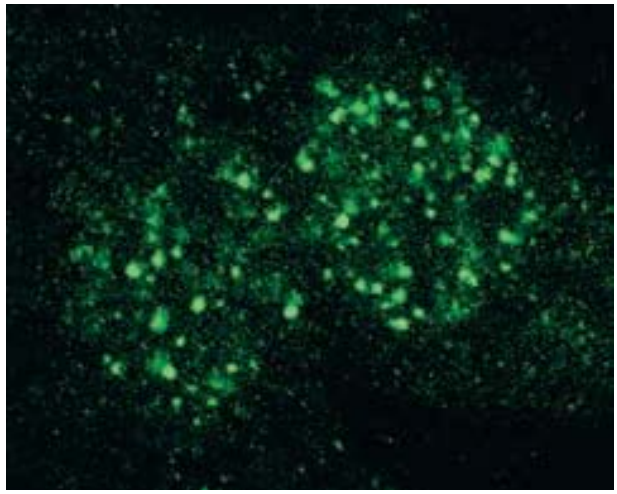


Figura 20.29 ▲
Migración y resolución de ramas. [Adaptado de Rafferty, J. B. et al. (1996). Crystal structure of DNA recombination protein RuvA and a model for its binding to the Holliday junction. *Science* 274:415-421]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

RECUADRO 20.2 Vínculos moleculares entre reparación de ADN y el cáncer de mama

Cada año en Norteamérica se diagnostican 180 000 casos de cáncer de mama en mujeres. Más o menos la quinta parte de esos casos nuevos tiene un componente familiar o genético, y un tercio de ellos, o 12 000 casos, se deben a mutaciones en uno de los dos genes cuyos nombres son BRCA1 o BRCA2 que codifican proteínas con el mismo nombre.



▲ La radiación ionizante induce focos nucleares de la proteína BRCA1 de reparación de ADN. Los rayos γ energéticos pueden inducir rupturas de doble hebra en el ADN y provocar la reparación del mismo. Este núcleo en célula de cultivo fue expuesto a radiación ionizante, y tratado después con anticuerpos que reconocen BRCA1.

Las dos proteínas se necesitan para la reparación recombinante normal de rupturas de doble hebra (DSB). En las células, el BRCA2 forma un complejo con el homólogo RAD51 RecA eucariótico. También el BRCA2 se une específicamente al BRCA1 formando un heterotrímero. Después de una exposición a la radiación ionizante, estas tres proteínas de reparación de ADN se encuentran localizadas en sitios discretos, o focos, dentro de los núcleos de interfase (véase más adelante). Es posible que esos focos catalicen la reparación de DSB en el genoma. Las proteínas BRCA son tan vitales, que las células se vuelven susceptibles a daños si alguna copia del gen se daña. Cuando una o las dos copias de los genes BRCA1 o BRCA2 son defectuosas, se altera la capacidad de reparar DSB, y al final se produce mayor frecuencia de mutaciones. Algunas de esas mutaciones nuevas pueden permitir que la célula escape de las restricciones rigurosas impuestas por el ciclo de la célula eucariótica, causando finalmente cáncer. Las proteínas BRCA funcionan como centinelas y vigilan en forma continua al genoma para identificar y corregir lesiones mutagénicas potenciales. De hecho, algunos humanos con una rara enfermedad autosómica recesiva, llamada anemia de Fanconi (FA, *Fanconi's anemia*) tienen mayor sensibilidad a varios compuestos mutagénicos y predisposición genética a muchos y diversos tipos de cáncer. Se ha demostrado que los pacientes con FA se afectan en uno de siete genes distintos que tal vez sean importantes para la reparación de ADN. El gen FANC-B en realidad es BRCA2, lo que subraya su papel esencial en el proceso de reparación.

Resumen

1. La replicación del ADN es semiconservativa; cada hebra del ADN sirve como plantilla para la síntesis de una hebra complementaria. Los productos de la replicación son dos moléculas hijas de doble hebra, formadas por una hebra parental y una hebra recién sintetizada. La replicación de ADN es bidireccional y avanza en ambas direcciones a partir de un origen de replicación.
2. Las ADN polimerasas, como la ADN polimerasa III en E. coli, agregan nucleótidos a una cadena creciente de ADN al catalizar reacciones de transferencia de grupo nucleotidilo. La síntesis del ADN procede en la dirección $5' \rightarrow 3'$. Los errores en la síntesis del ADN se eliminan por actividad de exonucleasa $3' \rightarrow 5'$ de la polimerasa. Algunas ADN polimerasas contienen una actividad adicional de exonucleasa $5' \rightarrow 3'$.
3. La hebra líder del ADN se sintetiza en forma continua, pero la hebra retrasada se sintetiza en forma discontinua produciendo fragmentos de Okazaki. La síntesis de la hebra líder y de cada fragmento de Okazaki comienza con un ARN cebador. En E. coli, el cebador se elimina y se reemplaza por ADN por acción de ADN polimerasa I. La acción de la ADN ligasa une los fragmentos separados de la hebra retrasada.
4. El replisoma es una máquina compleja de proteína que se ensambla en la horquilla de replicación. El replisoma contiene dos moléculas de ADN polimerasa más proteínas adicionales, como helicasa y primasa.
5. El ensamble del replisoma asegura la síntesis simultánea de dos hebras de ADN. En *E. coli*, una helicasa destuerce al ADN parental, y la SSB se une a las hebras separadas. La plantilla de la hebra separada circula por el replisoma, de modo que la síntesis de ambas hebras avance en la misma dirección que el movimiento de la horquilla de replicación. Al ser parte del replisoma, la ADN polimerasa es muy procesiva.
6. La iniciación de la replicación de ADN sucede en secuencias específicas del mismo (por ejemplo, *OriC* en *E. coli*) y depende de la presencia de otras proteínas. En las bacterias, la terminación de la replicación del ADN también se efectúa en sitios específicos y requiere de proteínas adicionales.
7. La replicación eucariótica del ADN se parece a la procariótica, pero los cromosomas eucarióticos contienen muchos orígenes de replicación, y los fragmentos de Okazaki eucarióticos son menores. El movimiento más lento de la horquilla de replicación en los eucariotas, comparado con los procariotas, se debe a la presencia de nucleosomas.
8. El ADN dañado por radiación o por sustancias químicas puede repararse con mecanismos de reparación directa, o mediante una ruta general de reparación por escisión. También, los mecanismos de reparación por escisión eliminan nucleótidos mal incorporados. Unas enzimas específicas reconocen nucleótidos dañados o mal incorporados.
9. Puede presentarse la recombinación cuando una sola hebra de ADN se intercambia con una hebra homóloga en ADN de doble hebra, produciendo un acoplamiento de Holliday. En *E. coli*, la RecA promueve la invasión de hebra. La migración de rama y la separación de los acoplamientos de Holliday son catalizados por RuvABC en *E. coli*.
10. La reparación y la recombinación son procesos parecidos, y usan muchas de las mismas enzimas. Los defectos en los genes humanos necesarios para reparación y recombinación causan sensibilidad a la luz ultravioleta y mayores riesgos de cáncer de la piel.

Problemas

1. El cromosoma de cierta bacteria es una molécula circular de ADN de doble hebra, con 5.2×10^6 pares de bases. El cromosoma contiene un origen de replicación y la velocidad de movimiento de la horquilla de replicación es de 1 000 nucleótidos por segundo.
   a) Calcule el tiempo que tarda en replicarse el cromosoma.
   b) Explique cómo el tiempo de generación bacteriana puede ser tan corto como 25 minutos, bajo condiciones extremadamente favorables.
2. En muchos ADN virales, los genes virales se pueden dividir en dos grupos separados: genes tempranos, cuyos productos se pueden detectar antes de la replicación del genoma viral, y genes tardíos, cuyos productos se acumulan en la célula infectada después de la replicación del genoma viral. Algunos virus, como el bacteriófago T4 y el T7, codifican sus propias enzimas de ADN polimerasa. ¿Es de esperar que el gen de la T4 ADN polimerasa sea de la clase temprana o tardía? ¿Por qué?
3. *a*) ¿Por qué la adición de SSB a reacciones de secuenciación hace aumentar con frecuencia el rendimiento de ADN?
   b) ¿Cuál es la ventaja de hacer reacciones de secuenciación a 65 °C usando ADN polimerasa aislada de bacterias que crecen a altas temperaturas?
4. ¿Cómo afecta el uso de un ARN cebador, y no de un ADN cebador, a la fidelidad de la replicación del ADN en *E. coli*?
5. Las dos hebras del ADN se sintetizan en la dirección $5' \rightarrow 3'$.

a) Trace un mecanismo hipotético de reacción para la síntesis de ADN en la dirección $3' \rightarrow 5'$ usando una 5′-dNTP y una cadena creciente con un grupo 5′-trifosfato.

b) ¿Cómo se afectaría la síntesis de ADN si la enzima hipotética tuviera actividad de corrección?

6. La ciprofloxacina es un antimicrobiano que se usa en el tratamiento de una gran variedad de infecciones bacterianas. Uno de los blancos de la ciprofloxacina en *E. coli* es la topoisomerasa II. Explique por qué la inhibición de la topoisomerasa II es un blanco eficaz para tratar infecciones por *E. coli*.

7. Todo el genoma de la mosca de la fruta, D. Melanogaster, consiste en 1.65×10^8 pares de bases. Si la replicación en una sola horquilla de replicación tiene una velocidad de 30 pares de bases por segundo, calcule el tiempo mínimo para replicar todo el genoma, si la replicación se iniciara

a) en un solo origen bidireccional

b) en 2 000 orígenes bidireccionales

c) En el embrión joven, la replicación puede tardar hasta cinco minutos. ¿Cuál es la cantidad mínima de orígenes necesaria para alcanzar este tiempo de replicación?

8. El etil metano sulfonato (EMS) es un agente alquilante reactivo que etila el residuo O-6 de guanina en el ADN. Si esta G modificada no se escinde y sustituye con una G normal, ¿cuál sería el resultado de una ronda de replicación de ADN?

9. ¿Por qué las células expuestas a la luz visible, después de irradiarlas con luz ultravioleta, tienen mayor tasa de supervivencia que las células mantenidas en la oscuridad después de irradiarlas con luz ultravioleta?

10. *E. coli* usa varios mecanismos para evitar la incorporación de la base uracilo en el ADN. Primero, la dUTPasa enzimática, codificada por el gen *dut*, degrada a la dUTP. Después, la enzima uracilo N-glicosilasa, codificada por el gen ung, elimina los uracilos que se han metido al ADN. Deben repararse los sitios apirimidínicos que resultan.

a) Si se examina el ADN de una cepa que tiene una mutación en el gen dut ¿qué se encontrará?

b) ¿Y si se examina el ADN de una cepa donde estén mutados los genes *dut* y *ung*?

11. Explique por qué la uracilo N-glicosilasa no puede reparar el daño cuando la 5-metilcitosina se desamina a timina.

12. ¿Por qué se observan altas tasas de mutación en las regiones de ADN que contienen metilcitosina?

13. Explique por qué la tasa general de errores en la replicación del ADN en *E. coli* es 10^{-9}, aproximadamente, aunque la tasa de mala incorporación por el replisoma es alrededor de 10^{-5}.

14. ¿Dependerá la reparación del ADN en E. coli del cofactor enzimático $NAD^{\oplus}$?

15. Describa dos métodos con los que se puedan reparar dímeros de pirimidina en *E. coli*.

16. El daño a una sola hebra de ADN se repara con facilidad mediante varios mecanismos, en tanto que los daños a las bases en ambas hebras del ADN son más difíciles para que los repare la célula. Explique por qué.

17. ¿Por qué la recombinación homóloga sólo se presenta entre ADN con secuencias idénticas o casi idénticas?

18. ¿Por qué hay dos enzimas ADN polimerasas distintas que se necesitan para replicar el cromosoma de *E. coli*?

Lecturas seleccionadas

Generalidades

Adams, R. L. P., Knowler, J. T. y Leader, D. P. (1992). *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, 11th ed. (New York: Chapman and Hall).

Kornberg, A. y Baker, T. (1992). *DNA Replication*, 2nd ed. (New York: W. H. Freeman).

Replicación de ADN

Beese, L. S., Derbyshire, V. y Steitz, T. A. (1993). Structure of ADN polymerase I Klenow fragment bound to duplex DNA. *Science* 260:352-355.

Bell, S. P. (2002). The origin recognition complex: from simple origins to complex functions. *Genes & Devel.* 16:659-672.

Davey, M. J., Jeruzalmi, D. Kuriyan, J. y O'Donnell, M. (2002). Motors and switches: AAA+ machines within the replisome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:1-10.

Gilbert, D. M. (2001). Making sense of eukaryotic DNA replication origins. *Science* 294:96-100.

Keck, J. L. y Berger, J. M. (2001). Primus inter pares (First among equals). *Nat. Struct. Biol.* 8:2-4.

Kong, X.-P., Onrust, R., O'Donnell, M. y Kuriyan, J. (1992). Three-dimensional structure of the β-subunit of *E. coli* DNA polymerase III holoenzyme: a sliding DNA clamp. *Cell* 69:425-437.

Kunkel, T. A. y Bebenek, K. (2000). DNA Replication fidelity. *Annu. Rev. Biochem.* 61:673-719.

Marians, K. J. (1992). Prokaryotic DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* 61:673–719.

McHenry, C. S. (1991). DNA polymerase III holoenzyme. *J. Biol. Chem.* 266:19127-19130.

Radman, M. (1998). DNA replication: One strand may be more equal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:9718-9719.

Wake, R. G. y King, G. F. (1997). A tale of two terminators: crystal structures sharpen the debate on DNA replication fork arrest mechanisms. *Structure* 5:1-5.

Waga, S. y Stillman, B. (1998). The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* 67:721-751.

Wyman, C. y Botchan, M. (1995). A familiar ring to DNA polymerase processivity. *Curr. Biol.* 5:334-337.

Reparación del ADN

Echols, H. y Goodman, M. F. (1991). Fidelity mechanisms in DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* 60:477-511.

Kogoma, T. (1997). Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:212-238.

McCullough, A. K., Dodson, M. L. y Lloyd, R. S. (1999). Initiation of base excision repair: glycosylase mechanisms and structures. *Annu. Rev. Biochem.* 68:255-285.

Mol, C. D., Parikh, S. S., Putnam, C. D., Lo, T. P. y Taylor, J. A. (1999). DNA repair mechanisms for the recognition and removal of damaged DNA bases. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28:101-128.

Tainer, J. A., Thayer, M. M. y Cunningham. R. P. (1995). DNA repair proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol*. 5:20-26.

Yang, W. (2000). Structure and function of mismatch repair proteins. *Mutat. Res.* 460:245-256.

Recombinación

Ortiz-Lombardia, M., González, A., Ertja, R., Aymami, J., Azorin, F. y Coll, M. (1999). Crystal structure of a Holliday junction. *Nat. Struct. Biol.* 6:913-917.

Rafferty, J. B., Sedelnikove, S. E., Hargeraves, D., Artmiuk, P. J., Baker, P. J., Sharples, G. J., Mahdi, A. A., Lloyd, R. G. y Rice, D. W. (1996). Crystal structure of DNA recombination protein RuvA and a model for its binding to the Holliday junction. *Science* 274:415-421.

Rao, B. J., Chiu, S. K., Bazemore, L. R., Reddy, G. y Radding. C. M. (1995). How specific is the first recognition step of homologous recombination? *Trends Biochem. Sci*. 20:109-113.

West, S. C. (1996). The RuvABC proteins and Holliday junction processing in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. 178:1237-1241.

West, S. C. (1997). Processing of recombination intermediates by the RuvABC proteins. *Annu. Rev. Genet.* 31:213-244.

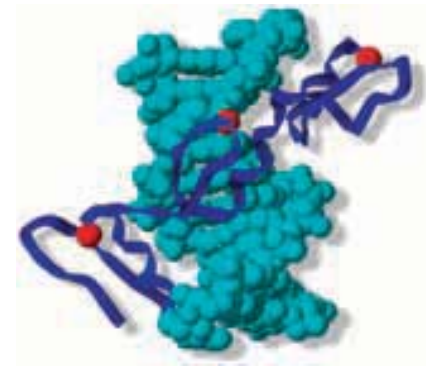
West, S. C. (2003). Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:1-11.

White, M. F., Giraud-Panis, M. -J. E., Pöhler, J. R. G. y Lilley, D. M. (1997). Recognition and manipulation of branched DNA structure by junction-resolving enzymes. *J. Mol. Biol.* 269:647-664.

Wuethrich, B. (1998). Why Sex? *Science* 281:1980-1982.

21

capítulo veintiuno



Transcripción y procesamiento del ARN

Como ya se dijo, la estructura del ADN propuesta por Watson y Crick en 1953 sugirió de inmediato un método para replicar el ADN y transferir información genética de una generación a la siguiente. Pero no revelaba la forma en que un organismo usa la información guardada en su material genético.

George Beadle y Edward Tatum propusieron, basándose en estudios sobre *Neurospora crassa*, moho del pan, que una sola unidad de herencia, o gen, dirige la producción de una sola enzima. En 1956 se obtuvo una demostración completa de la relación entre los genes y las proteínas, cuando Vernon Ingram demostró que la hemoglobina de pacientes que padecen anemia falciforme, una enfermedad hereditaria, era distinta de la hemoglobina normal por la sustitución de un solo aminoácido. Los resultados de Ingram indicaban que los cambios genéticos se pueden manifestar como cambios en la secuencia de aminoácidos en una proteína. Por extensión, la información contenida en el genoma debe especificar la estructura primaria de cada proteína en un organismo.

Se define un **gen** como una secuencia de ADN que se transcribe. En esta definición entran los genes que no codifican proteínas (no todos los transcritos son ARN mensajero). Normalmente, la definición excluye regiones del genoma que controlan la transcripción, pero que no se transcriben. Se encontrarán algunas excepciones a esta definición de gen: por sorpresa, no hay definición que sea enteramente satisfactoria.

Muchos genomas procarióticos contienen varios miles de genes, aunque algunas bacterias simples sólo tienen entre 500 a 600 genes. La mayor parte de ellos son "genes domésticos" que codifican proteínas o moléculas de ARN que son esenciales para las actividades normales en todas las células vivas. Por ejemplo, las enzimas que intervienen en procesos metabólicos básicos como la glicólisis y la síntesis de los aminoácidos y del ADN son codificadas por esos genes de limpieza, y también a los ARN de transferencia y ribosómico La cantidad de genes domésticos en los eucariotas unicelulares, como levaduras y algunas algas, es similar a la cantidad que hay en los procariotas complejos.

Además de los genes domésticos, todas las células contienen genes que sólo se expresan en circunstancias especiales, por ejemplo durante la división celular. Los

Arriba: Parte del factor de transcripción Zif268 murino (en azul oscuro) unido al ADN (azul claro). Las cadenas laterales de tres dominios con zinc interactúan con pares de bases en el ADN. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

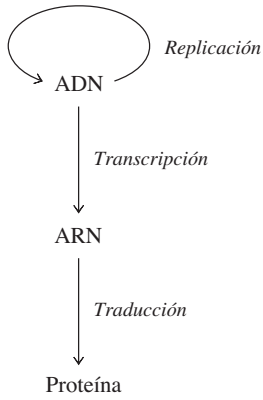


Figura 21.1 ▲
Flujo de la información biológica. El flujo normal de esa información es del ADN al ARN y a la proteína.

organismos multicelulares también contienen genes que sólo se expresan en ciertos tipos de células. Por ejemplo, todas las células en el árbol del maple (arce, liquidámbar u ocozol) contienen los genes para las enzimas que sintetizan clorofila, pero esos genes sólo se expresan en las células expuestas a la luz, como las que están en la superficie de una hoja. De forma parecida, todas las células en los mamíferos contienen genes de insulina, pero sólo ciertas células pancreáticas producen insulina. La cantidad total de genes en los eucariotas va desde 15 000 en *Drosophila melanogaster* a más de 50 000 en algunos otros animales.

En este capítulo y en el siguiente se examinará cómo la información almacenada en el ADN dirige la síntesis de las proteínas. Una descripción general de este flujo de información se resume en la figura 21.1. En este capítulo se describirá la transcripción (el proceso en el que la información guardada en el ADN se copia en el ARN, y así se pone a disposición para la síntesis de las proteínas, o para otras funciones celulares) y el procesamiento del ARN (la modificación de moléculas de ARN después de la transcripción). También se examinará en forma breve cómo se regula la expresión genética mediante factores que afectan la iniciación de la transcripción. En el capítulo 22 se analiza la traducción (el proceso en el que la información codificada en moléculas del ARNm dirige la síntesis de las proteínas individuales).

Una propiedad de la ruta completa que se describe en la figura 21.1 es que es irreversible. En particular, la información contenida en la secuencia de los aminoácidos de una proteína no se puede trasladar de regreso al ácido nucleico. Esta irreversibilidad de información se conoce como "dogma central" de la biología molecular, y fue predicha por Francis Crick en 1958, muchos años antes de que se desarrollaran los mecanismos de transcripción y traducción. La versión original del dogma central no excluía el flujo de información del ARN al ADN. Esa ruta fue descubierta, finalmente, en células infectadas por retrovirus; se llama transcripción inversa.

21.1 Tipos de ARN

En la extracción de información del ADN para producir las proteínas participan varias clases de moléculas de ARN. El *ARN de transferencia* (ARNt) lleva los aminoácidos a la máquina de la traducción. El *ARN ribosómico* (ARNr) forma gran parte del ribosoma. Una tercera clase de ARN es el *ARN mensajero* (ARNm), cuyo descubrimiento se debió en gran parte al trabajo de François Jacob, Jacques Monod y sus colaboradores en el Instituto Pasteur de París. A principios de la década de 1960, esos investigadores demostraron que los ribosomas participan en la síntesis de las proteínas al traducir moléculas inestables de ARN (ARNm). También descubrieron Jacob y Monod que la secuencia de una molécula de ARNm es complementaria de un segmento de una de las hebras del ADN. Una cuarta clase de ARN consiste en pequeñas moléculas de ARN que participan en varios eventos metabólicos, incluyendo el procesamiento del ARN. Muchas de esas moléculas pequeñas de ARN tienen actividad catalítica.

▲ Jacques Monod (1910-1976). Él y Jacob recibieron el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1965, por su trabajo sobre el control genético de la síntesis enzimática.

Un gran porcentaje del ARN total en una célula es el ARN ribosómico, y sólo un porcentaje pequeño es el ARNm. Pero si se comparan las velocidades a las que la célula sintetiza el ARN, y no las cantidades de ARN en estado estable, se ve una imagen diferente (tabla 21.1). Aun cuando el ARNm sólo forma el 3% del ARN total en *Escherichia coli*, la bacteria dedica casi la tercera parte de su capacidad de síntesis del ARN a la producción del ARNm. De hecho, este valor puede aumentar hasta un 60% cuando la célula crece con lentitud y no necesita reemplazar ribosomas ni ARNt. La discrepancia entre las cantidades de diversas moléculas del ARN en estado estable, y las velocidades con que se sintetizan, se puede explicar por las distintas estabilidades de las moléculas del ARN: las moléculas de ARNr y ARNt son extremadamente estables, en tanto que el ARNm se degrada rápidamente después de la traducción. En las células bacterianas, la mitad del ARNm recién sintetizado se degrada por nucleasas en menos de tres minutos. En los eucariotas, la vida media del ARNm es unas 10 veces mayor. La estabilidad relativamente alta del ARNm eucariótico se debe a eventos de procesamiento que evitan que se degrade durante el transporte desde el núcleo, donde sucede la transcripción, al citoplasma.

◀ François Jacob (1920-).

TABLA 21.1 Contenido de ARN en una célula de *E. coli*

Tipo	Contenido de estado estable	Capacidad sintética[a]
rARN	83%	58%
tARN	14%	10%
mARN	3%	32%
ARN cebadores[b]	<1%	<1%
Otras moléculas de ARN[c]	<1%	<1%

[a] Cantidad relativa de cada tipo de ARN que se sintetiza en cualquier instante.

[b] ARN cebadores son los que se usan en la replicación de ADN; no son sintetizados por la ARN polimerasa.

[c] Otras moléculas de ARN incluyen varias enzimas ARN, como el componente ARN de la RNasa P.

[Adaptado de Bremer, H. y Dennis, P. P. (1987). Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate. En *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, Vol. 2. F. C. Neidhart, ed. (Washington, D. C., American Society for Microbiology), pp. 1527-1542.]

21.2 ARN polimerasa

En la misma época en que se identificó el ARNm, en forma independiente los investigadores de varios laboratorios descubrieron una enzima que cataliza la síntesis del ARN cuando se suministra ATP, UTP, GTP, CTP y una molécula de ADN de plantilla. La enzima recién descubierta fue ARN polimerasa. Esta enzima cataliza la síntesis del ARN dirigida por ADN, o **transcripción**.

Al principio, la ARN polimerasa fue identificada por su capacidad para catalizar la polimerización de ribonucleótidos, pero estudios posteriores de la enzima indicaron que ésta hace mucho más. La ARN polimerasa es el núcleo de un complejo de transcripción mayor (así como la ADN polimerasa es el centro de un complejo mayor de replicación, sección 20.4). Este complejo ensambla en un extremo de un gen cuando se inicia la transcripción. Durante el inicio, el ADN plantilla se desenrolla parcialmente y se sintetiza un tramo corto del ARN. En la fase de elongación de la transcripción, la ARN polimerasa cataliza la elongación procesiva de la cadena del ARN, en tanto que el ADN se destuerce y se tuerce continuamente. Por último, el complejo de transcripción responde a señales específicas de terminación de la transcripción y se desensambla.

Aunque la composición del complejo de transcripción varía en forma considerable entre diferentes organismos, todos los complejos de transcripción catalizan en esencia las mismas clases de reacciones. El proceso general de la transcripción se presentará al describir las reacciones catalizadas por el complejo de transcripción en *E. coli*. En la sección 21.5 se presentarán los complejos de transcripción eucarióticos más complicados.

TABLA 21.2 Subunidades de la holoenzima ARN polimerasa de *E. coli*

Subunidad	M_r
β'[a]	155 600
β	150 600
σ[b]	70 300[c]
α	36 500
ω	11 000

[a] Las subunidades β y β' no se relacionan, a pesar de la semejanza de sus nombres.

[b] Esta subunidad no es parte de la ARN polimerasa central.

[c] El peso molecular es para la subunidad σ que se encuentra en la forma más común de la holoenzima.

A. ARN polimerasa: proteína oligomérica

La ARN polimerasa central se aísla de las células de *E. coli* como una proteína multimérica, con cuatro tipos diferentes de subunidades (tabla 21.2). Cinco de esas subunidades se combinan con una estequiometría de $\alpha_2\beta\beta'\omega$ para formar la enzima central que participa en muchas de las reacciones de transición. Las grandes subunidades β y β' forman el sitio activo de la enzima; la subunidad β' contribuye a la unión con el ADN, en tanto que la subunidad β contiene parte del sitio activo de la polimerasa. Las subunidades α son los andamios para armar las demás subunidades; también interactúan con muchas proteínas que regulan la transcripción. El papel de la subunidad pequeña ω no se ha caracterizado bien.

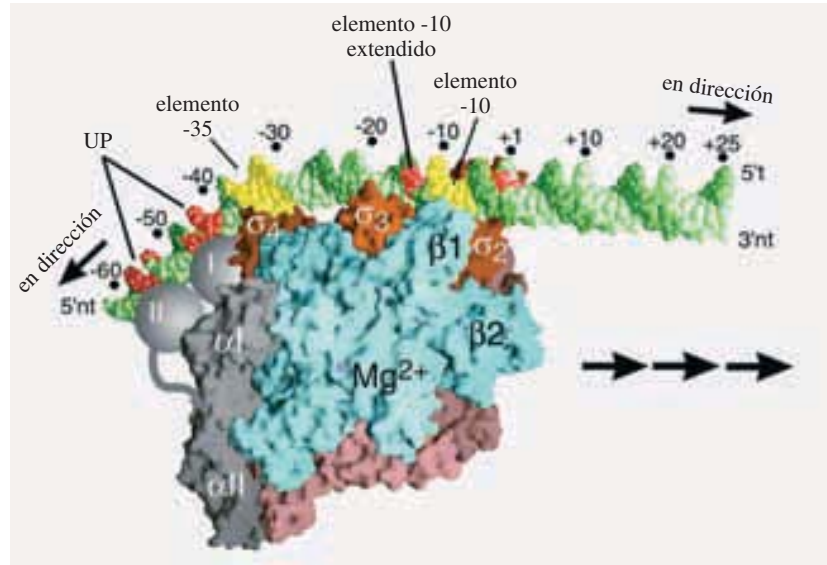


Figura 21.2 ▶
Complejo cerrado de la holoenzima ARN polimerasa/ADN promotor de *Thermus aquaticus* (*taq*). La hebra de plantilla es verde oscura y la hebra de codificación verde claro; los elementos –10 y –35 son amarillos. El sitio de inicio de la transcripción se muestra en rojo y se identifica con +1. Una vez que se forme el complejo abierto, la transcripción avanzará en dirección 3′, a la derecha, como indican las flechas. Las subunidades α y ω se muestran en gris; la subunidad β es azul cielo, y la subunidad β′ es color de rosa. La subunidad σ es anaranjada. *Fuente:* Reproducido con autorización de Murakami et. al., Science 296:1285-1290 (2002). Fig. 5A. American Association for the Advancement of Science. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

La estructura de la holoenzima ARN polimerasa acomplejada con el ADN de la bacteria *Thermus aquaticus* se ve en la figura 21.2. Las subunidades β y β' forman una hendidura grande en un extremo. Es aquí donde se une el ADN y se efectúa la polimerización. El surco es lo bastante grande como para contener unos 16 pares de bases de B-ADN de doble hebra, y su forma es como la de los sitios de unión con el ADN de las ADN polimerasas (como la ADN polimerasa I, figura 20.12). El par de subunidades α está en el "extremo trasero" de la molécula. Esta región también está en contacto con el ADN cuando la polimerasa transcribe un gen. La subunidad ω está unida a la superficie exterior de la subunidad β'. Después se verá que hay diversos factores de transcripción que interactúan con la ARN polimerasa, uniéndose a las subunidades σ. La subunidad σ de la holoenzima tiene un papel importante en el inicio de la transcripción. Las bacterias contienen varios tipos distintos de subunidades σ. La forma principal de la holoenzima en *E. coli* contiene la subunidad σ^{70} (M_r 70 300). Las subunidades σ están en contacto con el ADN durante el inicio de la transcripción, y se unen a la enzima central en la región de la subunidad ω. Las dimensiones generales de la ARN polimerasa son $10 \times 10 \times 16$ nm. Es bastante más grande que un nucleosoma, pero menor que un ribosoma o un replisoma.

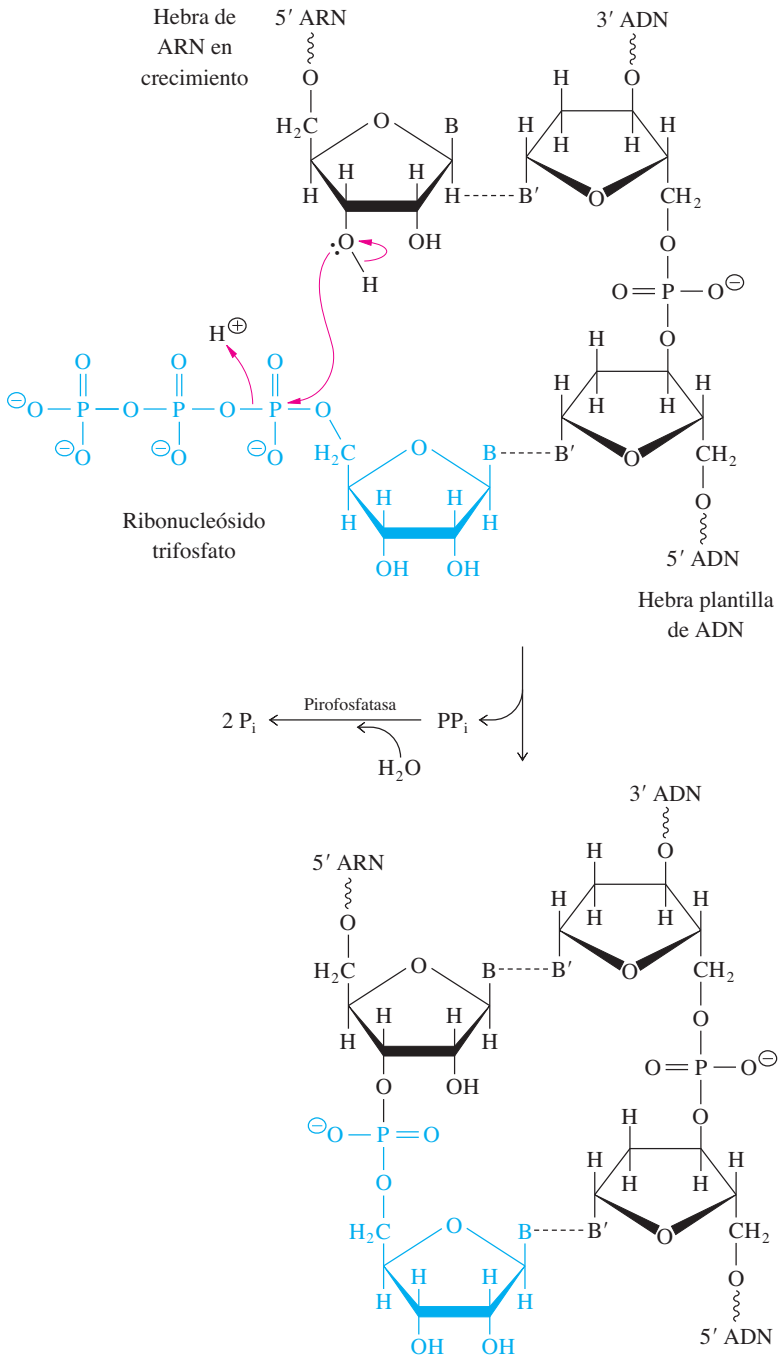
B. Reacción de elongación de la cadena

La ARN polimerasa cataliza el alargamiento de la cadena con un mecanismo casi idéntico al que usa la ADN polimerasa (figura 20.6). Parte de la cadena del ARN en crecimiento se aparea con las bases de la hebra plantilla del ADN, y los ribonucleósido trifosfatos que llegan se prueban en el sitio activo de la polimerasa para ver si tienen los puentes de hidrógeno correctos con el siguiente nucleótido no apareado de la hebra de plantilla. Cuando el nucleótido que entra forma los puentes de hidrógeno correctos, la ARN polimerasa cataliza una reacción de transferencia de grupo nucleotidilo, que resulta en la formación de un nuevo enlace fosfodiéster, y la liberación de pirofosfato (figura 21.3).

Como la ADN polimerasa III, la ARN polimerasa cataliza la polimerización en dirección $5' \rightarrow 3'$, y es muy procesiva cuando está unida al ADN como parte de un complejo de transcripción. La reacción general de la síntesis del ARN se puede resumir como sigue:

$$\mathrm{RNA}_n - \mathrm{OH} + \mathrm{NTP} \longrightarrow \mathrm{RNA}_{n+1} - \mathrm{OH} + \mathrm{PP}_i$$
$$\Delta G^{\circ\prime} = -9\ kJ\ mol^{-1} \qquad \textbf{(21.1)}$$

Igual que la reacción de la ADN polimerasa, la de la ARN polimerasa es asistida termodinámicamente por la hidrólisis siguiente del pirofosfato dentro de la célula. Por lo tan-



◀Figura 21.3
Reacción catalizada por la ARN polimerasa. Cuando un ribonucleósido trifosfato entrante se aparea en forma correcta con el siguiente nucleótido no apareado en la hebra de plantilla de ADN, la ARN polimerasa cataliza un ataque nucleofílico del grupo 3′-hidroxilo de la hebra creciente de ARN, al átomo de fósforo α- del ribonucleósido trifosfato entrante. El resultado es que se forma un fosfodiéster y se libera un pirofosfato. La hidrólisis siguiente del pirofosfato catalizada por la pirofosfatasa suministra una fuerza impulsora termodinámica adicional para la reacción. (B y B′ representan bases complementarias, y los puentes de hidrógeno entre las bases se representan por líneas interrumpidas).

to, en último término se invierten dos enlaces fosfoanhídrido por cada nucleótido agregado a la cadena en crecimiento.

La ARN polimerasa difiere de la ADN polimerasa porque usa ribonucleósido trifosfatos (UTP, GTP, ATP y CTP) y no desoxirribonucleósido trifosfatos (dTTP, dGTP, dATP y dCTP). Otra diferencia es que la hebra del ARN en crecimiento sólo interactúa con la hebra de plantilla en una distancia corta (véase más adelante). El producto final de la transcripción es ARN de una hebra, y no dúplex de ARN-ADN. Además, la transcripción es más lenta que la replicación del ADN. En *E. coli*, la rapidez de transcripción va de 30 a 85 nucleótidos por segundo, menos de la décima parte de la rapidez de replicación del ADN.

La ARN polimerasa cataliza la formación de un nuevo enlace fosfodiéster sólo cuando el ribonucleósido trifosfato entrante cabe con exactitud en el sitio activo de la enzima. Un ajuste preciso requiere apilamiento de base y puentes de hidrógeno correctos entre el ribonucleósido trifosfato entrante y el nucleótido de plantilla.

No obstante el requisito de un ajuste de gran precisión, la ARN polimerasa hace errores. La frecuencia de errores en la síntesis del ARN es de 10^{-6} (un error por cada millón de nucleótidos incorporados). Esta frecuencia es mayor que la tasa total de errores en la síntesis del ADN, porque la ARN polimerasa no posee una actividad de exonucleasa de corrección, como la que se suele encontrar en las ADN polimerasas. Es necesaria una precisión extrema en la replicación del ADN para minimizar mutaciones que pudieran pasarse a la progenie, pero para la supervivencia no es tan crucial la exactitud en la síntesis del ARN.

21.3 Inicio de la transcripción

A las reacciones de elongación en la síntesis del ARN antecede un paso de inicio distinto, donde un complejo de la transcripción se ensambla en un sitio de inicio y se sintetiza un tramo corto de ARN. Las regiones del ADN que sirven como sitios de inicio de la transcripción se llaman **promotoras**. En las bacterias con frecuencia se cotranscriben varios genes a partir de un solo promotor; a esa unidad de la transcripción se le llama **operón**. En las células eucarióticas, cada gen suele tener su propio promotor. Hay cientos de promotores en las células bacterianas, y miles en las células eucarióticas.

La frecuencia de inicio de la transcripción en determinado promotor se suele relacionar con la necesidad del producto de ese gen en particular. Por ejemplo, en las células que se dividen con rapidez, los genes del ARN ribosómico se transcriben con frecuencia; cada pocos segundos un nuevo complejo de transcripción comienza a transcribir en el promotor. Este proceso origina estructuras como las que se ven en la figura 21.4, que muestra varios complejos de la transcripción en un operón del ARN ribosómico en *E. coli*. Los transcritos de longitudes cada vez mayores se alinean junto con los genes, porque muchas ARN polimerasas transcriben los genes al mismo tiempo. En estos casos, el inicio puede ocurrir una vez por algunas horas. (Fuera del laboratorio, el tiempo promedio de generación de la mayor parte de las bacterias es de muchas horas.)

A. Orientación 5′ → 3′ de los genes

En la sección 19.2A se introdujo la convención de que las secuencias del ácido nucleico de una hebra se escriben de izquierda a derecha, con la dirección 5′ → 3′. Cuando se representa una secuencia de ADN de doble hebra, la secuencia de la hebra superior

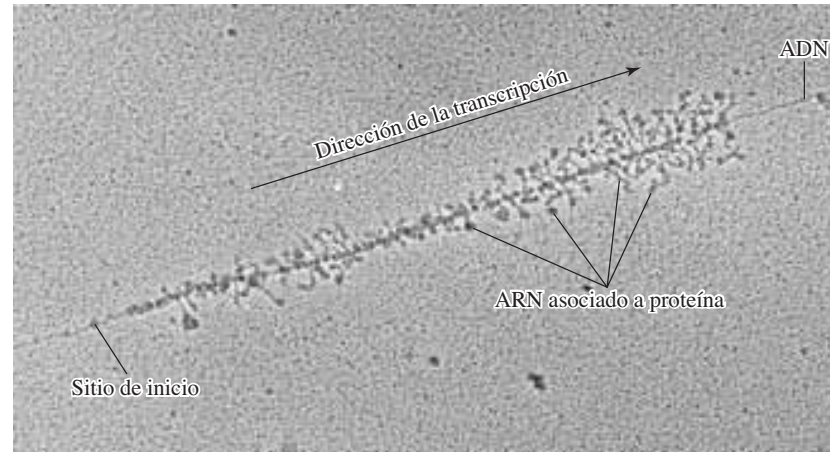


Figura 21.4 ▶
Transcripción de genes de ARN ribosómico en *E. coli*. Los genes se transcriben de izquierda a derecha. El ARNr producto naciente se asocia a proteínas y es procesado por escisión nucleolítica para que la transcripción sea completa.

se escribe de 5′ → 3′, y la secuencia de la hebra inferior, antiparalela, se escribe de 3′ → 5′ (de izquierda a derecha).

Como aquí la definición operacional de un gen es una secuencia de ADN que se transcribe, un gen comienza en el punto donde se inicia la transcripción (identificado con +1) y termina en el punto donde termina la transcripción. El inicio de un gen se llama extremo 5′, y corresponde a la conversión para secuencias de escritura. Avanzar a lo largo de un gen en la dirección de 5′ → 3′ se llama avanzar "en dirección 3′", y avanzar en dirección de 3′ → 5′ es avanzar "en dirección 5′" (en pocas ocasiones se dice "corriente abajo" y "corriente arriba", respectivamente). La polimerización del ARN avanza en la dirección de 5′ → 3′. En consecuencia, de acuerdo con la convención de escritura de secuencias de ADN, el sitio de inicio de la transcripción en un gen se pone a la derecha de un diagrama de ADN de doble hebra, y el sitio de terminación a la derecha. La hebra superior se llama **hebra codificante**, porque su secuencia corresponde a la versión, en el ADN, del ARNm que codifica la secuencia de los aminoácidos en una proteína. La secuencia inferior se llama **hebra (de) plantilla** porque es la hebra que se usa como plantilla para la síntesis del ARN (figura 21.5). En forma alternativa, a la hebra superior se le puede llamar **hebra sentido** (o **hebra codificante**, o **hebra homosentido**) para indicar que los ribosomas de traducción que tratan de "leer" los codones en un ARNm con esta secuencia ensamblarán la proteína correcta. Entonces, la hebra inferior será la **hebra antisentido**, porque un ARNm con esta secuencia no formará la proteína correcta. Nótese que el ARN se sintetiza en la dirección de 5′ → 3′ pero que la hebra plantilla se copia desde su extremo 3′ hasta su extremo 5′. También, nótese que el producto del ARN tiene secuencia idéntica a la de la hebra codificante, excepto que U sustituye a T.

B. El complejo de transcripción se ensambla en un promotor

Tanto en los procariotas como en los eucariotas se forma un complejo de transcripción cuando una o más proteínas se unen a la secuencia promotora, y también a la ARN polimerasa. Estas proteínas de unión con el ADN dirigen a la ARN polimerasa hacia el sitio promotor. En las bacterias, la subunidad σ de la ARN polimerasa es necesaria para reconocer al promotor y formar el complejo de transcripción.

La secuencia de los nucleótidos en un promotor es uno de los factores más importantes que afectan la frecuencia de la transcripción de un gen. Poco después del desarrollo de la tecnología de secuenciación del ADN, se examinaron muchas proteínas

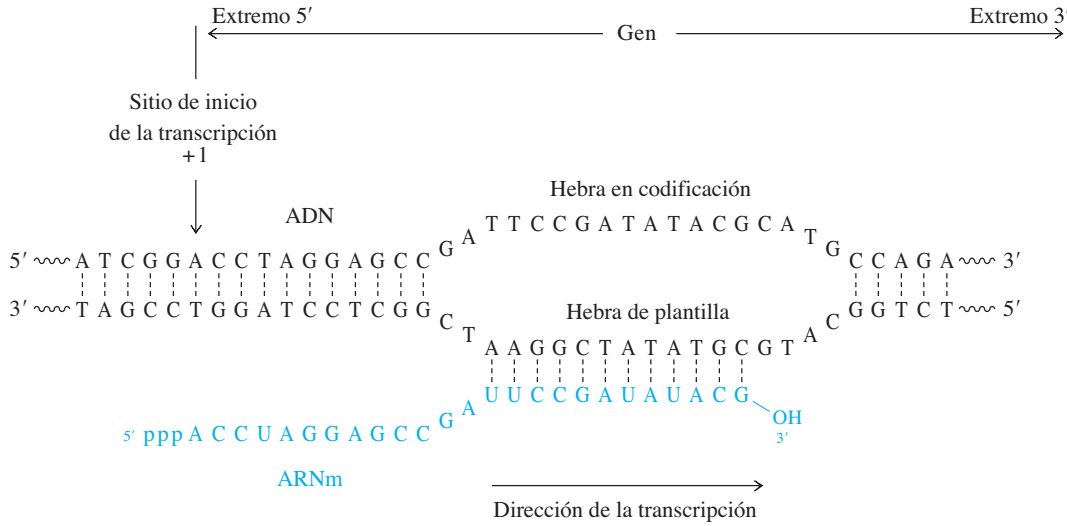


Figura 21.5 ▲
Orientación de un gen. Se muestran la secuencia de un gen hipotético y el ARN transcrito a partir de éste. Por convención, se dice que el gen se transcribe del lado 5′ al lado 3′, pero la hebra de plantilla de ADN se copia del extremo 3′ al extremo 5′. El crecimiento de la cadena de ribonucleótido avanza de 5′ → 3′.

diferentes. Se identificaron los sitios de inicio, donde en realidad se inicia la transcripción, y se secuenciaron las regiones en dirección 5′ a partir de esos sitios, o para ver si eran similares las secuencias promotoras de distintos genes. Este análisis reveló una pauta común llamada **secuencia de consenso**, una secuencia hipotética formada por los nucleótidos que se encuentran con más frecuencia en cada posición.

La secuencia de consenso del tipo más común del promotor en *E. coli* se muestra en la figura 21.6. Este promotor es bipartido, que quiere decir que hay dos regiones separadas de similitud de secuencia. La primera región está a 10 pb en dirección 5′ del sitio de inicio de la transcripción, y es rica en pares de bases A/T. La secuencia de consenso es TATAAT. La segunda parte de la secuencia promotora se centra a unos 35 pb en dirección 5′ del sitio de inicio. La secuencia de consenso en esta región es TTGACA. La distancia promedio entre las dos partes del promotor es 17 pb.

La región en −10 se llama **caja TATA**, y la región en −35 sólo se llama **región −35**. Juntas, las dos definen al promotor de la holoenzima de *E. coli* que contiene σ^{70}, la subunidad σ más común en las células de *E. coli*. La holoenzima que contiene a σ^{70} se une en forma específica a secuencias que se parecen a la secuencia de consenso. Otras subunidades σ en *E. coli* reconocen y se unen a los promotores con secuencias de consenso muy diferentes (tabla 21.3). Las secuencias de consenso en los promotores pueden ser diferentes en otras especies de bacteria.

Una secuencia de consenso no es exacta, pero indica los nucleótidos que se encuentran con más frecuencia en cada posición. Muy pocos promotores tienen sus secuencias de consenso en forma exacta. En algunos casos la coincidencia es muy mala, y G o C se encuentran en posiciones que por lo regular ocupan A o T. Esos promotores se llaman débiles, y suelen asociarse a genes que se transcriben con poca frecuencia. Los promotores fuertes, como los de los operones del ARN ribosómico, se parecen mucho a la secuencia de consenso. Esos operones se transcriben con mucha eficiencia. Observaciones como estas parecen indicar que la secuencia de consenso describe a la secuencia del promotor más eficiente para la holoenzima ARN polimerasa.

Figura 21.6 ▲
Secuencias promotoras de 10 genes de bacteriófago y bacterianos. Todas estas secuencias promotoras se reconocen por la subunidad σ^{70} en *E. coli.* Las secuencias de nucleótido se alinean para que sus regiones +1, –10 y –35 queden en registro. Nótese el grado de variación de secuencias en cada posición. La secuencia consenso se derivó de una base de datos mucho más grande, con más de 300 promotores bien caracterizados.

TABLA 21.3 Subunidades σ en *E. coli*

Subunidad	Gen	Genes transcritos	Consenso	
			−35	−10
σ^{70}	*rpo*D	Muchos	TTGACA	TATAAT
σ^{54}	*rpoN*	Metabolismo de nitrógeno	Ninguno	CTGGCACNNNNNTTGCA[a]
σ^{38}	*rpo*S	Fase estacionaria	?	TATAAT
σ^{28}	*fla*I	Síntesis flagelar y quimiotaxia	TAAA	GCCGATAA
σ^{32}	*rpo*H	Choque térmico	CTTGAA	CCCATNTA[a]
σ^{gp55}	gene 55	Bacteriófago T4	Ninguno	TATAAATA

[a] N representa a cualquier nucleótido.

Es probable que la secuencia del promotor de cada gen haya sido optimizada por selección natural para ajustarse a las necesidades de la célula. Un promotor ineficiente es ideal para un gen cuyo producto no se necesita en grandes cantidades, en tanto que un promotor eficiente es necesario para obtener grandes cantidades de un producto genético.

C. Reconocimiento del promotor por la subunidad σ

El efecto de las subunidades σ, que también se llaman factores σ, sobre el reconocimiento del promotor se puede explicar mejor comparando las propiedades de unión del ADN de la polimerasa central y la holoenzima que contiene σ^{70}. La polimerasa central, que carece de la subunidad σ, se une al ADN en forma no específica; no tiene más afinidad hacia promotores que hacia cualquier otra secuencia del ADN (la constante de asociación, K_{asoc}m es 10^{10} M^{-1}, aproximadamente). Una vez formado, este complejo del ADN y proteína se disocia con lentitud ($t_{1/2} \approx 60$ minutos). En contraste, la holoenzima, que contiene la subunidad σ^{70}, se une con más fuerza a secuencias promotoras ($K_{asoc} \approx 2 \times 10^{11}$ M^{-1}) que la polimerasa central, y forma complejos más estables ($t_{1/2} \approx 2$ a 3 horas). Aunque la holoenzima se une de preferencia a secuencias promotoras, también tiene una afinidad apreciable hacia el resto del ADN en una célula ($K_{asoc} \approx 5 \times 10^{6}$ M^{-1}). El complejo formado por la unión no específica de la holoenzima con el ADN se disocia rápidamente ($t_{1/2} \approx 3$ s). Estos parámetros de enlace revelan las funciones de la subunidad σ^{70}. Uno de los papeles de σ^{70} es disminuir la afinidad de la polimerasa central hacia secuencias no promotoras. Otro papel de igual importancia es aumentar la afinidad de la polimerasa central hacia secuencias promotoras específicas.

Las constantes de asociación no indican la forma en que la holoenzima ARN polimerasa encuentra al promotor. Podría esperarse que la holoenzima buscara el promotor uniéndose y disociándose continuamente hasta encontrar una secuencia de promotor. Esas uniones serían una reacción de segundo orden, y su velocidad estaría limitada por la velocidad con la que se difunde la holoenzima en tres dimensiones. Sin embargo, la unión de promotor es 100 veces más rápida que el valor teórico máximo para una reacción de segundo orden limitada por difusión. Esta notable la velocidad que se logra por la difusión unidimensional de la ARN polimerasa a lo largo de la molécula del ADN. Durante el corto tiempo en que la enzima se une en forma no específica, puede recorrer 2 000 pb en busca de una secuencia promotora. Otras proteínas de unión con el ADN, de secuencia específica, como las enzimas de restricción (sección 19.6C), ubican sus sitios de unión en una forma parecida.

D. Cambios de conformación en la ARN polimerasa

El inicio de la transcripción es lento, aun cuando la holoenzima busque y se una con mucha rapidez al promotor. De hecho, con frecuencia el inicio es el paso limitante de velocidad de la transcripción, porque se requiere destorcer la hélice del ADN y sinteti-

zar un tramo corto del ARN que sirve como cebador para la siguiente elongación de la cadena. Durante la replicación del ADN, esos pasos los hace una helicasa y una primasa, pero en la transcripción los efectúa la misma holoencima ARN polimerasa. A diferencia de las ADN polimerasas, las ARN polimerasas pueden iniciar la síntesis del polinucleótido por sí mismas en presencia de los factores de iniciación, como σ^{70}.

El destorcimiento del ADN en el sitio de inicio es un ejemplo del cambio de conformación en donde la ARN polimerasa (R) y el promotor (P) se pasan de un complejo cerrado (RP_c) a uno abierto (RP_o). En el complejo cerrado, el ADN tiene doble hebra. En el complejo abierto, 18 pares de bases de ADN se destuercen y forman una burbuja de transcripción. La formación del complejo abierto suele ser el paso más lento de los eventos de inicio.

Una vez que se forma el complejo abierto, la hebra de la plantilla se posiciona en el sitio de polimerización de la enzima. En el siguiente paso, se forma un enlace fosfodiéster entre dos ribonucleósido trifosfatos que se han difundido al sitio activo y formado puentes de hidrógeno con los nucleótidos +1 y +2 de la hebra de plantilla. La reacción es más lenta que la reacción análoga de polimerización durante el alargamiento de la cadena, donde uno de los sustratos (la cadena del ARN en crecimiento) se sujeta en su lugar por la formación de una hélice corta de ARN-ADN.

Entonces se agregan más nucleótidos al dinucleótido para crear un ARN corto que está apareado con la hebra de plantilla. Cuando este ARN tiene unos 10 nucleótidos de longitud, la holoenzima ARN polimerasa sufre una transición del modo de iniciación al de elongación, y el complejo de transcripción se aleja del promotor a lo largo de la plantilla del ADN. Este paso se llama despeje del promotor. La reacción de inicio se puede resumir como sigue:

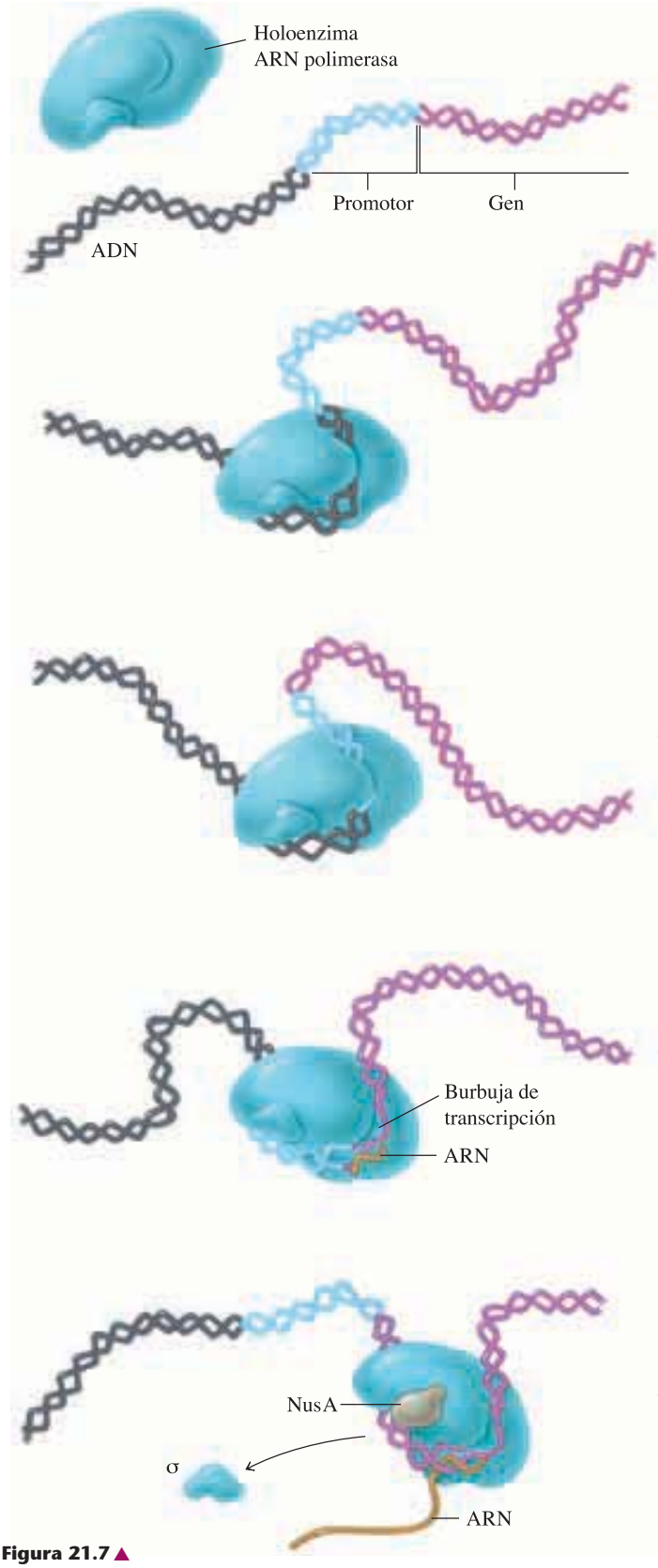
$$R + P \overset{K_{asoc}}{\longleftrightarrow} RP_c \xrightarrow[\text{cambio de conformación}]{} RP_o \xrightarrow[\text{hueco de promotor}]{} \quad \textbf{(21.2)}$$

Como se indicó antes, la holoenzima que contiene el factor σ tiene mucha mayor afinidad hacia la secuencia del promotor que hacia cualquier otra secuencia del ADN. Debido a esta fuerte unión, resiste el alejamiento del sitio de inicio. Sin embargo, durante el alargamiento, la polimerasa central se une en forma no específica a todas las secuencias del ADN para formar un complejo muy procesivo. La transición del inicio a la elongación de la cadena se relaciona con un cambio de conformación en la holoenzima que causa la liberación de la subunidad σ. Sin σ, la enzima ya no se une en forma específica al promotor y puede alejarse del sitio de inicio. En ese momento, varias proteínas accesorias se unen a la polimerasa central para crear la máquina completa de proteína necesaria para el alargamiento de la cadena del ARN. La unión de NusA, una de esas proteínas accesorias, ayuda a convertir a la ARN polimerasa a la forma de alargamiento. El complejo de elongación es responsable de la mayor parte de la síntesis del ARN. También, la NusA interactúa con otras proteínas accesorias y tiene un papel en la terminación. El inicio de la transcripción en *E. coli* se resume en la figura 21.7.

21.4 Terminación de la transcripción

Sólo se transcriben ciertas regiones del ADN. Los complejos de transcripción se ensamblan en promotores, y en las bacterias se desensamblan en el extremo 3′ de los genes en secuencias específicas llamadas **secuencias de terminación**. Hay dos clases de terminaciones de la transcripción. La forma más sencilla de terminación se presenta en ciertas secuencias del ADN, donde el complejo de elongación es inestable y, en forma espontánea, el complejo de transcripción se desensambla. Otras formas de terminación necesitan una proteína específica, de nombre *rho*, que facilita el desensamble.

La terminación de la transcripción sucede con frecuencia cerca de **sitios de pausa**. Son regiones del gen donde la velocidad de elongación se desacelera o se detiene en forma temporal. Por ejemplo, como es más difícil fundir pares de bases G/C que contienen tres puentes de hidrógeno que fundir pares de bases A/T con dos puentes de



a) La holoenzima ARN polimerasa se une en forma no específica al ADN.

b) La holoenzima hace una búsqueda unidimensional de un promotor.

c) Cuando se encuentra un promotor, la holoenzima y el promotor forman un complejo cerrado.

d) Un cambio de conformación, del complejo cerrado a un complejo abierto, produce una burbuja de transcripción en el sitio de inicio. Entonces se sintetiza un tramo corto de ARN.

e) La subunidad σ se disocia de la enzima central y la ARN polimerasa aleja al promotor. Unas proteínas accesorias, incluyendo NusA, se unen a la polimerasa.

Figura 21.7 ▲
Inicio de la transcripción en *E. coli.* (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

hidrógeno, un complejo de transcripción hace una pausa al encontrar una región rica en GC.

Las pausas son exageradas en los sitios donde la secuencia del ADN es palindrómica, o tiene simetría diada (sección 19.6C). Cuando se transcribe el ADN, el ARN recién sintetizado puede formar una horquilla (figura 21.8). (En la figura 19.21 se ve una representación tridimensional de esa estructura). La formación de una horquilla de ARN puede desestabilizar el híbrido de ARN-ADN en el complejo de elongación, al desprender una parte del ARN recién transcrito. Es probable que esta alteración parcial de la burbuja de transcripción haga que el complejo de transcripción cese la elongación hasta que se vuelva a formar el híbrido. La NusA aumenta las pausas en sitios palindrómicos, quizá estabilizando la horquilla. De acuerdo con la estructura de la horquilla, el complejo de transcripción puede hacer una pausa de 10 segundos a 30 minutos.

En *E. coli*, algunos de los sitios de pausas grandes son secuencias de terminación. Esos sitios de terminación están en el extremo 3′ de un gen, más allá de la región que codifica la cadena del polipéptido (para genes que codifican proteínas) o del ARN funcional completo (para otros genes). Esos sitios especifican una estructura de horquilla de ARN que se une débilmente a la hebra plantilla por un tramo corto de pares de bases A/U. Son los pares de base más débiles posible, y se separan con facilidad durante la pausa. La disrupción causa la liberación del ARN del complejo de transcripción.

El otro tipo de secuencias bacterianas de terminación, las que requieren *rho*, se llaman *rho*-dependientes, o dependientes de *rho*. También, *rho* dispara el desensamble de los complejos de transcripción en algunos sitios de pausa. Tiene una proteína hexamérica con una potente actividad de ATPasa, y una afinidad hacia el ARN de una hebra. La *rho* también puede actuar como una ARN-ADN helicasa. Se une al ARN de una hebra que esté expuesto atrás de un complejo de transcripción en pausa, en una reacción acoplada a la hidrólisis del ATP. Unos 80 nucleótidos del ARN se enrollan en la proteína y hacen que el transcrito se separe del complejo de transcripción (figura 21.9). La terminación dependiente de *rho* se debe tanto a desestabilización del híbrido de ARN-ADN como al contacto directo entre el complejo de transcripción, cuando *rho* se une al ARN. También, *rho* se puede unir a NusA y otras proteínas accesorias; esta interacción puede hacer que la ARN polimerasa cambie de conformación y se disocie del ADN de plantilla.

La terminación dependiente de *rho* requiere que el ARN de una hebra quede expuesto. En las bacterias, el ARN transcrito de genes codificadores de proteínas se relaciona con los ribosomas, que interfieren con el enlazamiento de *rho*. Cuando la transcripción rebasa el punto donde termina la síntesis de la proteína, el ARN de una hebra queda

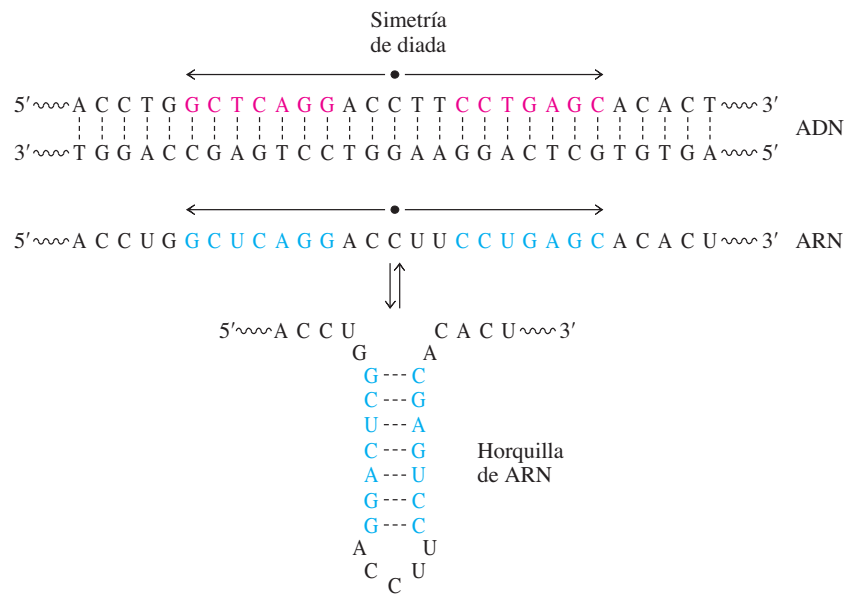


Figura 21.8 ▶
Formación de una horquilla de ARN. La secuencia transcrita de ADN contiene una región de simetría de diada. Las secuencias complementarias en el ARN pueden aparear bases para formar una horquilla.

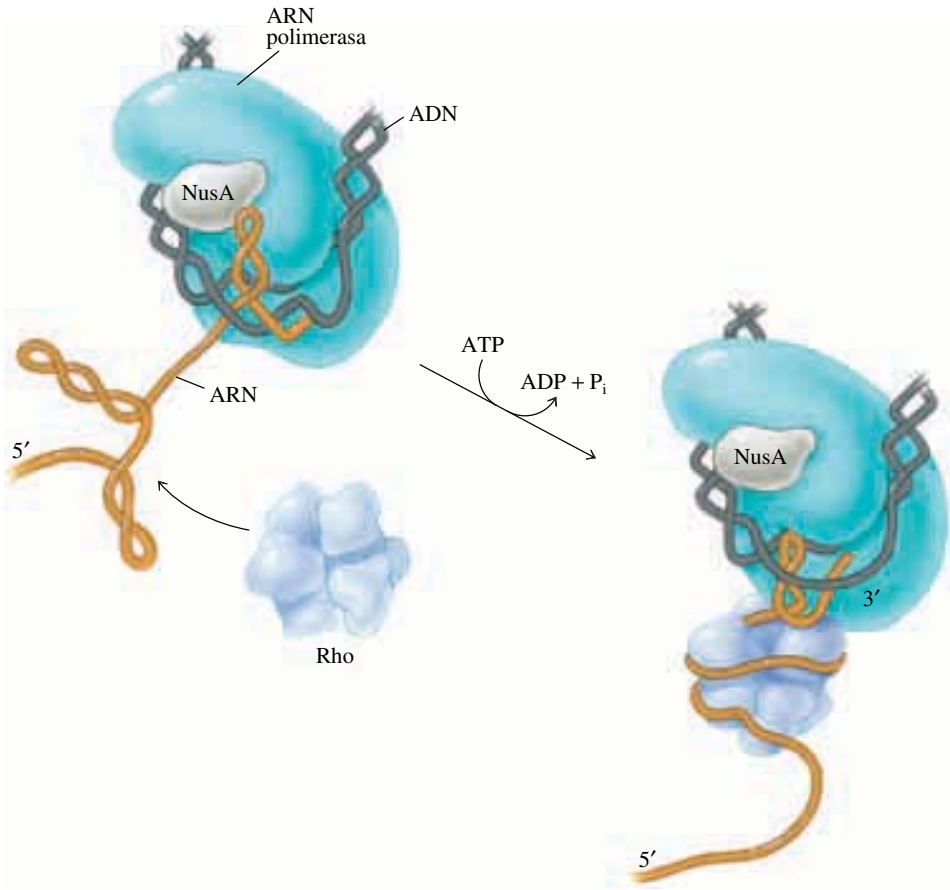


Figura 21.9 ▲
Terminación de la transcripción en *E. coli,* dependiente del factor rho. La ARN polimerasa se traba en un sitio de pausa donde se une el factor *rho* con el ARN recién sintetizado. Esta unión se acompaña con hidrólisis de ATP. Es probable que el factor *rho* envuelva la cadena naciente de ARN sobre sí misma y desestabilice así al híbrido ARN-ADN y la transcripción de terminación. [Adaptado de Platt, T. (1986). Transcription termination and the regulation of gene expression. *Annu. Rev. Biochem.* 55:339-372]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

expuesto y accesible a *rho*. La transcripción termina en el siguiente sitio de pausa disponible. En otras palabras, la terminación dependiente de *rho* no sucede en los sitios de pausa dentro de la región de codificación, pero puede estar en los sitios de pausa más allá del codón de terminación de la traducción. El efecto neto es acoplar la terminación de la transcripción con la traducción. Las ventajas de ese mecanismo de acoplamiento son que la síntesis de una región codificante del ARNm no se interrumpe (lo cual evitaría la síntesis de las proteínas) y que hay poca transcripción desperdiciada más allá de la región de codificación.

21.5 Transcripción en eucariotas

Los mismos procesos que hace una sola ARN polimerasa en *E. coli*, hacen varias enzimas similares en los eucariotas. Además, la actividad de los complejos de transcripción eucarióticos requiere muchas más proteínas accesorias.

A. ARN polimerasas eucarióticas

En los eucariotas, tres ARN polimerasas diferentes transcriben genes nucleares, y otras ARN polimerasas están en las mitocondrias y los cloroplastos. Cada enzima nuclear

TABLA 21.4 ARN polimerasas eucarióticas

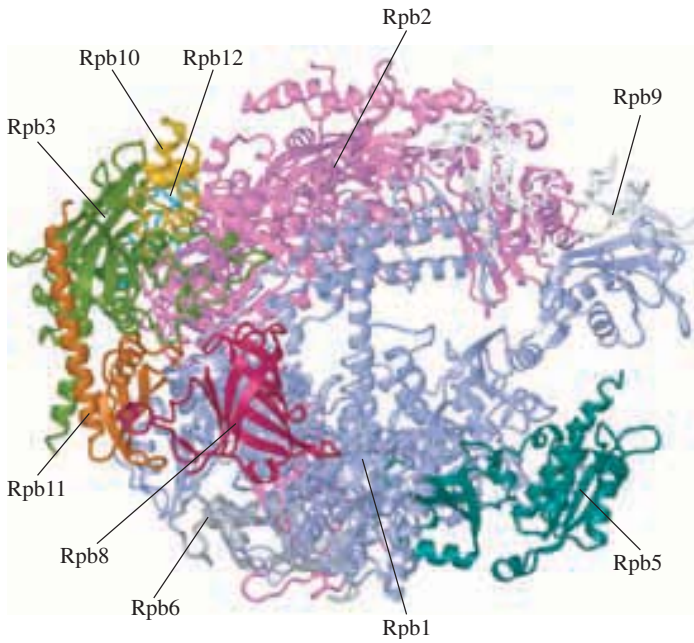
Polimerasa	Localización	Copias por célula	Productos	Actividad polimerasa de la célula
ARN polimerasa I	Nucléolo	40000	35-47S pre-ARNr	50–70%
ARN polimerasa II	Nucleoplasma	40000	Precursores ARNm U1, U2, U4 y U5 ARNsn	20–40%
ARN polimerasa III	Nucleoplasma	20000	55 ARNr ARNt ARNsn U6 ARN 7S Otras moléculas ARN pequeñas	10%
ARN polimerasa mitocondrial	Mitocondria	?	Productos de todos los genes de mitocondrias	<1%
ARN polimerasa cloroplasto	Cloroplasto	?	Productos de todos los genes de cloroplastos	<1%

transcribe una clase diferente de genes (tabla 21.4). La ARN polimerasa I transcribe genes que codifican moléculas grandes de ARN ribosómico (genes clase I). La ARN polimerasa II transcribe genes que codifican proteínas, y algunos que codifican moléculas pequeñas de ARN (genes clase II). La ARN polimerasa III transcribe genes que codifican varias moléculas pequeñas de ARN, incluyendo ARNt y 5S ARNr (genes clase III). (Algunas de las moléculas de ARN que aparecen en la tabla se describirán en las siguientes secciones).

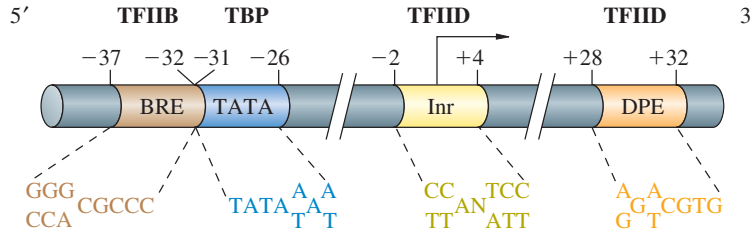
La versión mitocondrial de la ARN polimerasa es una enzima monomérica codificada por el genoma nuclear. Es bastante parecida, en secuencia de aminoácidos, a las ARN polimerasas de los bacteriófagos T3 y T7. Esta similitud parece indicar que esas enzimas tienen un ancestro común. Es probable que el gen de la ARN polimerasa mitocondrial haya sido transferido al núcleo del genoma mitocondrial primitivo.

Con frecuencia, los genomas de cloroplasto contienen genes que codifican su propia ARN polimerasa. Los genes que codifican la ARN polimerasa de cloroplastos tienen una secuencia parecida a los de la ARN polimerasa en las cianobacterias. Es una prueba más de que los cloroplastos, igual que las mitocondrias, se originaron en endosimbiontes bacterianos en células eucarióticas ancestrales.

Las tres ARN polimerasas nucleares son enzimas complejas de varias subunidades. Difieren en composición de subunidades, aunque tienen varios polipéptidos pequeños en común. La cantidad exacta de subunidades en cada polimerasa varía entre los organismos, pero siempre hay dos subunidades grandes, y 7 a 12 más pequeñas (figura 21.10). La ARN polimerasa II transcribe todos los genes codificantes de las proteínas igual que algunos genes que codifican pequeñas moléculas de ARN. El ARN codificante de proteínas sintetizado por esta enzima se llamó al principio ARN nuclear heterogéneo (hnARN), pero ahora se le conoce con más frecuencia como ARNm precursor. El procesamiento de este precursor para llegar a ARNm maduro se describirá en la sección 21.9. En las grandes células eucarióticas se encuentran unas 40 000 moléculas de ARN polimerasa II; la actividad de esta enzima ocupa más o menos entre el 20 al 40% de todas las síntesis celulares del ARN. Las dos subunidades más grandes de cada ARN polimerasa eucariótica se parecen en secuencia a las subunidades β y β' de la ARN polimerasa de *E. coli*, lo que parece indicar que comparten un ancestro común. A diferencia de sus contrapartes procarióticas, las ARN polimerasas eucarióticas no se unen por sí mismas a plantillas del ADN. La ARN polimerasa II requiere cinco actividades bioquímicas o factores diferentes para formar un complejo basal de transcripción capaz de iniciar la transcripción en un promotor eucariótico mínimo (figura 21.11). Estos fac-



◀Figura 21.10
ARN polimerasa II de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La subunidad grande, de color púrpura (Rpb2) es el homólogo de la subunidad β de la enzima procariótica de la figura 21.2. [PDB 1EN0]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).



◀Figura 21.11
Promotor eucariótico genérico mostrando los elementos basal o promotores "centrales". La caja TATA se describe en el texto. La BRE es el elemento de reconocimiento TFIIB. La DPE es el elemento promotor en dirección 3. Los nombres de los factores que se unen a cada sitio se muestran arriba del promotor. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

tores de transcripción general (GTF, *general transcription factor*) son: TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF y TFIIH (tabla 21.5).

Muchos genes de clase II contienen una región rica en A/T, que también se llama caja TATA, cuya función es parecida a la de la caja TATA procariótica descrita antes

TABLA 21.5 Algunos factores de transcripción representativos de la ARN polimerasa II

Factor	Características
TFIIA	Se une a TFIID; puede interactuar con TFIID en ausencia de ADN
TFIIB	Interactúa con la ARN polimerasa II
TFIID	Factor de inicio de la ARN polimerasa II
TBP	Proteína de unión con TATA; subunidad de TFIID
TAFs	Factores asociados con TBP; muchas subunidades
TFIIE	Interactúa con la ARN polimerasa II
TFIIH	Se requiere para inicio; actividad de la helicasa; acopla la transcripción con la reparación de ADN
TFIIS[a]	Se une a la ARN polimerasa II; factor de elongación
TFIIF	Se une a la ARN polimerasa II; dos subunidades, RAP30 y RAP74
SP1	Se une a secuencias ricas en GC
CTF[b]	Familia de proteínas diferentes que reconocen la secuencia central CCAAT

[a] También se llama sII o RAP38.
[b] También se llama NP1.

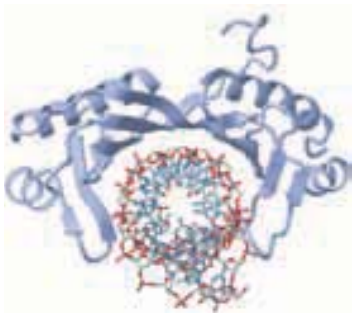


Figura 21.12 ▲
Proteína de unión TATA (TBP) de *Arabidopsis thaliana,* unida a ADN. La TBP (azul) está unida a un fragmento de ADN de doble hebra con una secuencia correspondiente a una caja TATA (5′-TATAAAG-3′). Se muestra el ADN como modelo de armazón de alambre. Nótese que la lámina β de la TBP está en el surco menor del fragmento del ADN. [PDB 1VOL]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

(recuérdese que las regiones ricas en A/T se destuercen con más facilidad para formar un complejo abierto, en especial si el ADN está superenrollado negativamente [sección 19.3]). Esta región eucariótica rica en A/T localizada 19 a 27 pb hacia el extremo 5′ a partir del sitio de inicio de transcripción, y sirve para reunir ARN polimerasa II con ADN durante el ensamble del complejo de inicio.

El factor general de transcripción TFIID es de varias subunidades, una de las cuales, la proteína de unión con TATA (TBP, *TATA-binding protein*), se une a la región que contiene a la caja TATA. En la figura 21.12 se muestra la estructura de la TBP de la planta *Arabidopsis thaliana*. La TBP forma una abrazadera molecular en forma de silla de montar, que casi rodea al ADN en la caja TTA. Los contactos principales entre TBP y ADN se deben a interacciones entre las cadenas laterales de los aminoácido en las hebras β y las orillas de los pares de base en el surco menor. Cuando la TBP se une al ADN, promotor en el ADN se flexiona para que ya no se parezca a la conformación normal del B-ADN. Es una interacción rara en las proteínas de unión con el ADN. La subunidad TPB del TFIID también se requiere para iniciar la transcripción de genes clase I y clase III por parte de las ARN polimerasas I y III, respectivamente.

La subunidad de la ARN polimerasa II homóloga a la subunidad β' del ARN procariótico tiene un dominio poco usual de carboxilo terminal (CTD, *carboxy-terminal domain*) o "cola" que consiste en varias repeticiones del heptámero de los aminoácidos PTSPSYS. Los residuos de Ser y Tre en la cola son objetivos de fosforilación para las cinasas nucleares. Las moléculas de la ARN polimerasa II con un CTD hiperfosforilado son de transcripción activa, o acopladas, en tanto que la pol II (polimerasa II) celular con CTD hipofosforilados suelen estar en reposo.

Si bien se ha demostrado que es posible purificar la ARN polimerasa II y cada GTF, y usarlos para reconstituir el inicio preciso de la transcripción *in vitro*, esos complejos basales de transcripción no pueden reconocer muchos y diversos tipos de factores de acción *trans* y secuencias de acción *cis* que se sabe tienen papeles importantes *in vivo*. La búsqueda de componentes celulares que puedan responder *in vitro* a activadores de transcripción condujo al descubrimiento de una holoenzima grande preformada, ARN pol II, que no sólo contiene los cinco GTF, sino también muchos otros polipéptidos que median interacciones entre las proteínas pol II y las proteínas de enlace con secuencias específicas del ADN.

B. Factores de transcripción eucarióticos

El TFIIA y el TFIIB son componentes esenciales del complejo de la holoenzima ARN polimerasa II. Ni el TFIIA ni el TFIIB se pueden unir al ADN en ausencia del TFIID. El TFIIF (que también se llama factor 5 o RAP30/74) se une a la ADN polimerasa II durante el inicio (figura 21.13). El TFIIF no tiene papel directo en el reconocimiento del promotor, pero es análogo a los factores bacterianos α en dos aspectos: disminuye la afinidad de la ARN polimerasa II hacia el sitio del promotor ADN, y ayuda a formar el

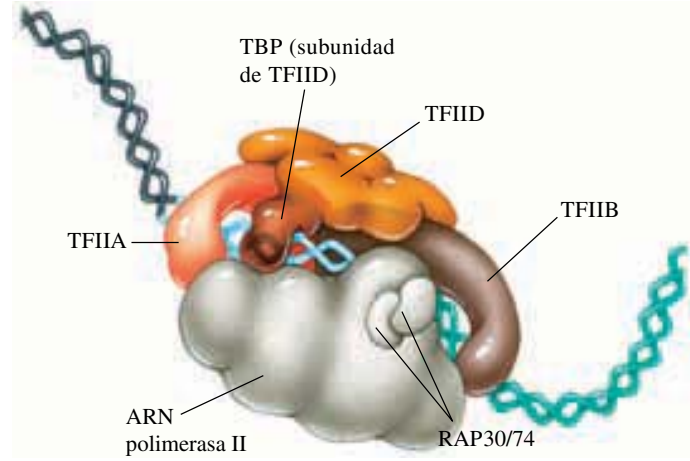


Figura 21.13 ▶
Complejo de la holoenzima ARN polimerasa II unido a un promotor. Este modelo muestra varios factores de transcripción unidos a la ARN polimerasa II en un promotor. Los factores de transcripción a menudo son más grandes y más complejos que los que se ven en este diagrama.

complejo abierto. El TFIIH, el TFIIE y otros factores menos caracterizados también son parte del complejo de inicio de transcripción.

Una vez que se ensambla el complejo de inicio en el sitio del promotor, los pasos siguientes son parecidos a los que hay en las bacterias. Se forma un complejo abierto, se sintetiza un tramo corto del ARN y el complejo de transcripción separa al promotor. La mayor parte de los factores de transcripción se disocian del ADN y de la ARN polimerasa II una vez iniciada la elongación. Sin embargo, el TFIIF puede permanecer unido, y un factor específico de alargamiento, el TFIIS (llamado también sII o RAP38) se une a la polimerasa que transcribe. El TFIIS puede tener un papel en las pausas y la terminación de la transcripción, parecido al papel de NusA en las bacterias.

A excepción del TBP, los factores de transcripción que interactúan con las demás ARN polimerasas no son los mismos que los que requiere la ARN polimerasa II.

C. Papel de la cromatina en la transcripción eucariótica

Como se indicó en el capítulo 19, el genoma eucariótico se empaca usando bloques de construcción pequeños y ubicuos, llamados nucleosomas, que contienen un octámero de las cuatro proteínas interiores de histona. Se estima que alrededor de 1% del genoma en los mamíferos se transcribe en genes codificantes de proteína, por lo que la mayor parte del ADN en una célula es relativamente inerte. Pero aun dentro de ese 1%, que contiene unos 30 000 genes diferentes, la mayor parte de las secuencias están en reposo. En cualquier célula individual, el estado de su cromatina es el determinante primario de la competencia del gen para ser transcrito. Este estado se modula con dos mecanismos. El primero consiste en llevar a cabo o eliminar modificaciones posteriores a la traslación en las ramas flexibles de los aminoácidos de las cuatro histonas centrales. Hay residuos específicos de Lys que son objetivos para la metilación o acetilación; otros residuos específicos de Arg también se pueden metilar, en tanto que las cadenas laterales de Ser y Thr se pueden fosforilar; diversas modificaciones sirven como señales para reunir activadores o represores de la cromatina. El segundo mecanismo para especificar el estado de transcripción de un gen eucariótico consiste en posicionamiento y remodelación del nucleosoma.

Los genes que no se transcriben son relativamente inaccesibles en el núcleo, en tanto que los que se transcriben están al alcance de los factores de transcripción de la holoenzima pol II y otras proteínas nucleares. ¿Cómo se mueve un gen entre esos dos estados conflictivos? La respuesta está en grandes complejos de varias proteínas (*multiproteínas*), descubiertos en fecha reciente, que convierten la energía de hidrólisis de ATP para remodelar físicamente los nucleosomas de un gen y permitir que las proteínas tengan acceso al ADN. Algunos de los complejos remodeladores contienen en realidad enzimas modificadoras de las histonas, como la histona acetilasa (HAT, *histone acetylase*) o la histona desacetilasa (HDAC, *histone deacetylase*).

21.6 Regulación de la transcripción de genes

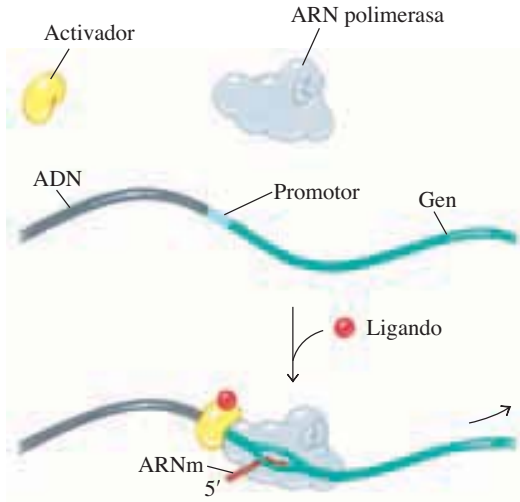
Como se dijo al comenzar este capítulo, muchos genes se expresan en cada célula. La expresión de esos genes domésticos se llama **constitutiva**. En general, esos genes tienen fuertes promotores y se transcriben con eficiencia y en forma continua. Los genes cuyos productos se requieren en poca cantidad suelen tener promotores débiles y se transcriben con poca frecuencia. Además de los genes expresados en forma constitutiva, las células contienen genes que se expresan en grandes cantidades en determinadas circunstancias, y no se expresan en otros casos. Se dice que esos genes están regulados.

La regulación de la expresión genética puede presentarse en cualquier punto del flujo de información biológica, pero con más frecuencia ocurre a nivel de la transcripción. Han evolucionado varios mecanismos que permiten que las células programen la expresión genética durante su diferenciación y desarrollo, y para responder a estímulos del ambiente.

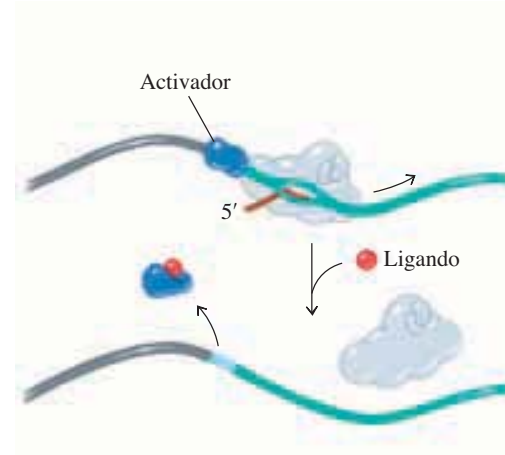
El inicio de la transcripción de los genes regulados está controlada por enzimas reguladoras que se unen a secuencias específicas del ADN. La regulación de la transcripción

puede ser negativa o positiva. Una proteína llamada **represor(a)** evita la transcripción de un gen regulado negativamente, sólo en ausencia de un represor activo. La transcripción de un gen regulado de manera positiva se puede activar con una proteína reguladora llamada **activador(a)**. Un gen regulado en forma positiva se transcribe mal, o no se transcribe, en ausencia del activador.

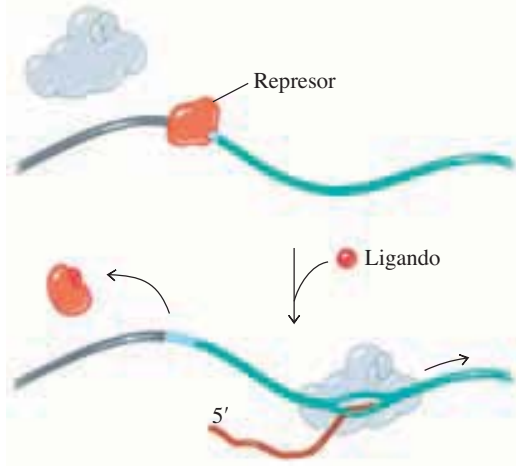
Los represores y los activadores se llaman con frecuencia proteínas alostéricas, y su función es modificada por unión con ligandos. En general, un ligando altera la conformación de la proteína y afecta su capacidad de unirse con secuencias específicas del ADN. Por ejemplo, algunos represores controlan la síntesis de enzimas para una ruta catabólica. En ausencia de un sustrato para esas enzimas, los genes se reprimen. Cuando está presente el sustrato, se une al represor y hace que se disocie del ADN y permita transcribir los genes. Los ligandos que se unen a represores y los inactivan se llaman



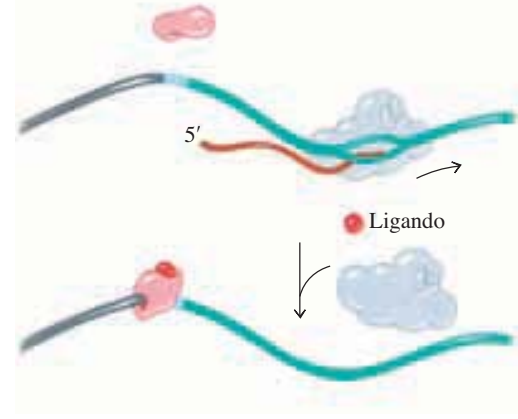
a) Un activador con ligando unido estimula la transcripción.



b) Un activador estimula la transcripción. En presencia de ligando, se inhibe el activador.



c) Un represor evita la transcripción. La unión del ligando (inductor) al represor inactiva al represor y permite la transcripción.



d) En ausencia del ligando, el represor no se une al ADN. La represión sólo sucede cuando está presente el ligando (correpresor).

Figura 21.14 ▲
Estrategias para regular el inicio de la transcripción por parte de proteínas reguladoras. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

inductores, porque inducen la transcripción de los genes controlados por los represores. En contraste, algunos represores que controlan la síntesis de enzimas para una ruta de biosíntesis sólo se unen al ADN cuando están asociados a un ligando. Con frecuencia, el ligando es el producto final de la ruta de biosíntesis. Este mecanismo regulador asegura que los genes se desactiven cuando se acumula el producto. Los ligandos que se unen a represores y los activan se llaman **correpresores**. La actividad de unión al ADN de los activadores alostéricos también se puede ver afectada en dos formas por la unión al ligando. En la figura 21.14 se ilustran cuatro estrategias generales para la regulación de la transcripción. Se han identificado ejemplos de las cuatro estrategias.

Hay pocos sistemas reguladores que sean tan simples como los que se describieron aquí. Por ejemplo, la transcripción de muchos genes está regulada por una combinación de represores y activadores, o por múltiples activadores. Han evolucionado mecanismos complicados para regular la transcripción a fin de cumplir con los requisitos específicos de los organismos individuales. Cuando la transcripción es regulada por un conjunto de mecanismos simultáneos, es posible una mayor variedad de respuestas celulares. Si se examina cómo se controla la transcripción de unos pocos genes en particular se podrá comenzar a comprender la forma en que pueden combinarse mecanismos positivos y negativos para producir la regulación notablemente sensible que se ve en las células bacterianas.

21.7 El operón *lac*, ejemplo de regulación positiva y negativa

Algunas bacterias obtienen el carbono que necesitan para crecer metabolizando azúcares de cinco o seis carbonos mediante glicólisis. Por ejemplo, *E. coli* usa glucosa de preferencia como fuente de carbono, aunque también puede usar otros azúcares, incluyendo β-galactósidos como la lactosa. Las enzimas necesarias para asimilar y catabolizar los β-galactósidos no se sintetizan, a menos que haya disponible un sustrato de β-galactósido. Aun en presencia del sustrato, esas enzimas se sintetizan en cantidades limitadas, cuando también está presente la fuente preferida de carbono (glucosa). La síntesis de las enzimas necesarias en la utilización de los β-galactósidos se regula a nivel del inicio de la transcripción, mediante un represor y un activador.

En el aprovechamiento y catabolismo de los β-galactósidos se requieren tres proteínas. El producto del gen *lac*Y es lactosa permeasa, transportador unidireccional (*transportador simporte*) responsable del aprovechamiento de los β-galactósidos. La mayor parte de los β-galactósidos se hidrolizan después para metabolizar hexosas mediante la actividad de la β-galactosidasa, una enzima grande con cuatro subunidades idénticas codificadas por el gen *lac*Z. Las β-galactosidasas que no se pueden hidrolizar se acetilan por la actividad de la tiogalactósido transacetilasa, producto del gen *lac*A. La acetilación ayuda a eliminar de la célula compuestos tóxicos.

Son tres los genes, *lac*Z, *lac*Y y *lac*A, que forman un operón que se transcribe desde un solo promotor para producir una molécula grande de ARNm que contiene tres regiones codificadoras de proteína separadas. En este caso se llamará gen a una región codificante de proteína, definición que difiere del uso normal del término. El arreglo de los genes con funciones relacionadas en un operón es eficiente, porque se pueden controlar las concentraciones de un conjunto de proteínas, transcribiéndolas desde un solo promotor. Los operones formados por genes codificadores de proteínas son comunes en *E. coli* y en otros procariotas, pero se creía que eran extremadamente raros en los eucariotas. Hoy se sabe que los operones también son muy comunes en *C. elegans*, organismo modelo, un nematodo o gusano redondo, y es probable que estén muy difundidos en este filum grande y antiguo.

A. Bloqueo de la transcripción por el represor *lac*

La expresión de los tres genes del operón *lac* está controlada por una proteína reguladora llamada represor *lac*, tetrámero de subunidades idénticas. El represor es codificado por un cuarto gen, *lac*I, que está ubicado justo arriba (en dirección 5) del operón *lac*, pero que se transcribe de un promotor separado (figura 21.15).

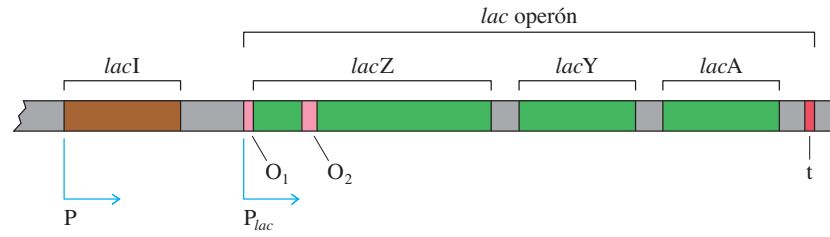


Figura 21.15 ▶
Organización de los genes que codifican las proteínas requeridas para metabolizar la lactosa. Las regiones codificantes de tres proteínas, *lacZ, lac*Y y *lac*A, forman el operón *lac* y se cotranscriben desde un solo promotor (P_{lac}). El gen que codifica al represor *lac* es *lac*I, y está hacia 5′ del operón *lac*; tiene su propio promotor, P. El represor *lac* se une a los operadores O_1 y O_2 cerca de P_{lac}. La t representa la secuencia de terminación de transcripción. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

El represor *lac* se une en forma simultánea a dos sitios del promotor del operón *lac*. Los sitios de unión de represor se llaman **operadores**. Un operador (O_1) está adyacente al promotor, y el otro (O_2) está dentro de la región codificante de *lacZ*. Cuando se une a los dos operadores, el represor hace que el ADN forme un bucle estable que se puede ver en micrografías electrónicas del complejo formado entre el represor *lac* y el ADN (figura 21.16). La interacción del represor *lac* con las secuencias del operador puede bloquear la transcripción al eliminar la unión de la ARN polimerasa con el promotor *lac*. Sin embargo, hoy se sabe que en algunos casos tanto el represor *lac* como la ARN polimerasa se pueden unir al promotor al mismo tiempo. Así, el represor puede bloquear el inicio de la transcripción al evitar la formación del complejo abierto y el despeje del promotor. En la figura 21.17 se ve un esquema del represor *lac* unido al ADN en presencia de la ARN polimerasa. En el diagrama se ve la relación entre los operadores, el promotor y el bucle del ADN que se forma cuando el represor se une al ADN.

El represor localiza a un operador uniéndose en forma no específica al ADN y buscando en una dimensión. (Recuérdese que en la sección 21.3C se dijo que la ARN polimerasa también usa esta clase de mecanismo de búsqueda). La constante de equilibrio de asociación para la unión de represor *lac* con O_1 *in vitro* es muy grande. El resultado es que el represor bloquea la transcripción de manera muy eficaz. (El represor *lac* se une al sitio O_2 con menor afinidad). Una célula bacteriana sólo contiene unas 10 moléculas del represor *lac*, pero el represor busca y encuentra un operador con tanta rapidez que cuando se disocia un represor del operador en forma espontánea, otro ocupa el lugar en un tiempo muy corto. Sin embargo, durante este breve intervalo se puede hacer una transcripción del operón, ya que la ARN polimerasa está anclada al promotor. Este bajo nivel de transcripción se llama síntesis de escape, y asegura que en una célula existan pequeñas cantidades de la lactosa permeasa y de la β-galactosidasa.

En ausencia de lactosa, el represor *lac* bloquea la expresión del operón *lac*, pero cuando hay disponibles de los β-galactósidos como fuentes potenciales de carbono, se transcriben los genes. Hay varios β-galactósidos que pueden ser inductores. Si la fuente disponible de carbono es la lactosa, el inductor es la alolactosa, que se produce a partir de la lactosa por acción de la β-galactosidasa (figura 21.18). La alolactosa se une fuertemente al represor *lac* y causa un cambio de conformación que reduce la afinidad del represor hacia los operadores. En presencia del inductor, el represor *lac* se disocia del ADN y permite que la ARN polimerasa inicie la transcripción. (Nótese que debido a la síntesis de escape, se puede tomar lactosa y convertir en alolactosa, aun cuando estén reprimidos los genes).

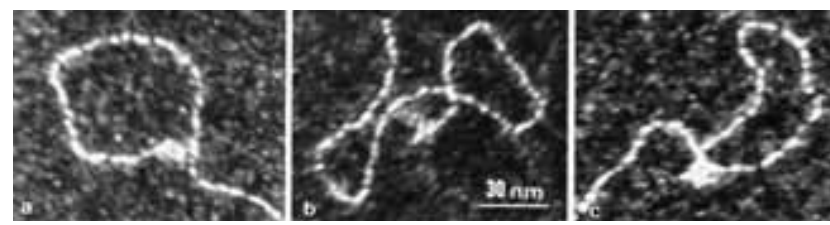
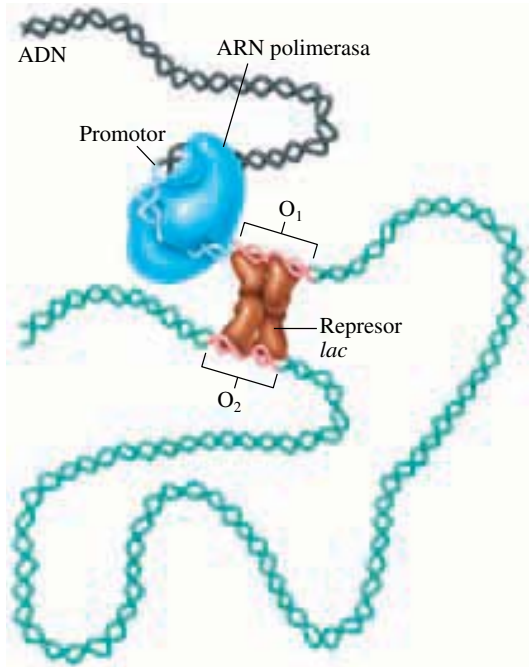


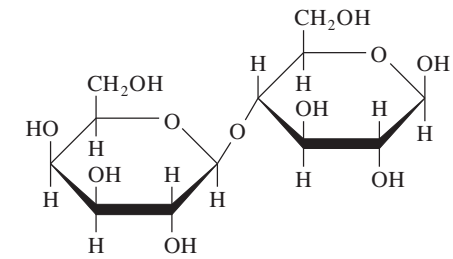
Figura 21.16 ▶
Micrografías electrónicas de bucles de ADN. Estos bucles se formaron mezclando represor *lac* con un fragmento de ADN que contenía dos sitios de unión con represor *lac*. Un sitio de unión está en un extremo del fragmento de ADN y el otro está a 535 pb de distancia. Se forman bucles de ADN de 535 pb de longitud cuando el represor tetramérico se une al mismo tiempo a los dos sitios.



◀Figura 21.17
Unión del represor *lac* con el operón *lac*. El represor *lac* tetramérico interactúa en forma simultánea con dos sitios cerca del promotor del operón *lac*. Entonces se forma un bucle de ADN. La ARN polimerasa se puede seguir uniendo al promotor en presencia del complejo represor *lac*-ADN. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

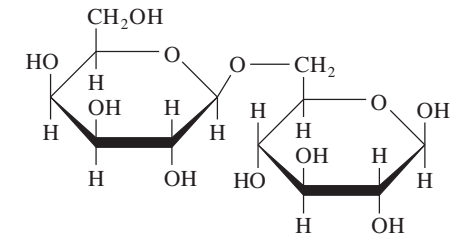
B. Estructura del represor *lac*

El papel del represor *lac* para regular la expresión del operón *lac* se conoce desde la década de 1960. Sin embargo, sólo hasta la década de 1990 se aclaró la estructura de esta importante proteína, con el desarrollo de nuevas técnicas para determinar la estructura de moléculas grandes. En la figura 21.19 se muestra la estructura de una parte del represor



Lactosa
(β-D-Galactopiranosil-(1→ 4)-β-D-glucopiranosa)

β-Galactosidasa



Alolactosa
(β-D-Galactopiranosil-(1→ 6)-β-D-glucopiranosa)

◀Figura 21.18
Formación de alolactosa a partir de lactosa, catalizada por la β-galactosidasa. Es una reacción menor o lateral. La principal actividad enzimática de la β-galactosidasa es romper los disacáridos para formar monómeros que se puedan convertir en sustratos para la glicólisis.

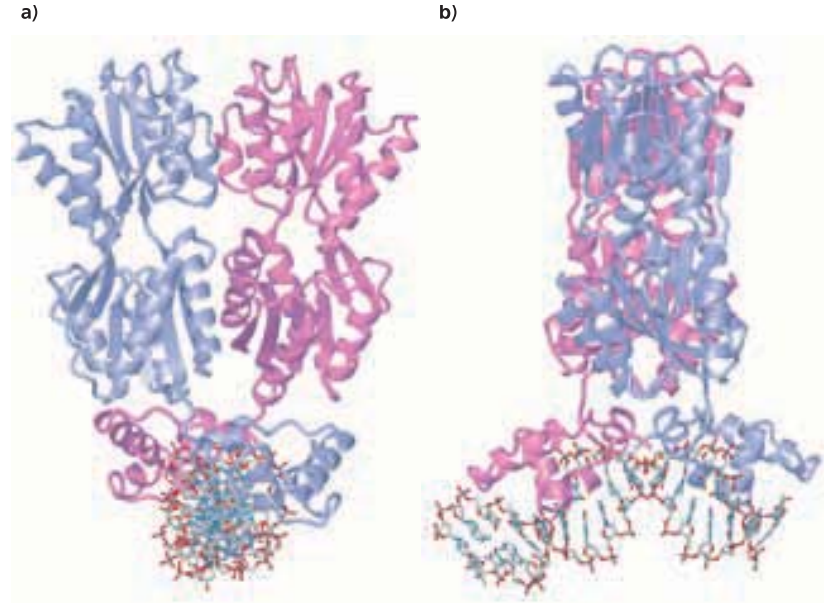


Figura 21.19 ▶
Estructura del represor *lac* de *E. coli*. Esta figura muestra un dímero de las subunidades del represor *lac* unidas a ADN. El represor *lac* es un tetrámero *in vivo*, y contiene dos sitios de unión con ADN. **a)** Vista de la punta de la molécula de ADN. **b)** Vista lateral que muestra la hélice α del represor *lac* en el surco mayor. [PDB 1EFA]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

lac unido a una secuencia del operador. La proteína completa contiene cuatro subunidades completas dispuestas en dos pares, y cada par de subunidades se une a una secuencia diferente del operador. Dentro de la célula, esos dos fragmentos del ADN son partes de una sola molécula del ADN, y la unión del represor forma un bucle de ADN en el extremo 5′ del operón *lac*.

Las subunidades se unen entre sí en una región de bisagra. La estructura cristalográfica por rayos X revela que los dos pares de subunidades están apilados uno sobre otro y no se extienden alejándose de la región de bisagra, como se esperaba. Esto hace una proteína más compacta que es menos simétrica que muchas otras proteínas tetrámeras.

Cada subunidad contiene un motivo de hélice-giro-hélice en los extremos más alejados de la región de bisagra. Cuando se une con el ADN, una de las α hélices está en la ranura mayor, donde las cadenas de los aminoácidos interactúan en forma directa con los pares de bases específicos de la secuencia del operador. Las dos hélices de cada par de subunidades se colocan aproximadamente una vuelta de ADN aparte (unos 10 pb), y cada una interactúa con la mitad de la secuencia del operador. Esta estrategia de unión se parece a la de la endonucleasa de restricción *Eco*Ri (sección 19.6C).

En ausencia de ADN, las regiones distales de las subunidades de represor *lac* están desordenadas. Es una de las razones por las que tardó tanto tiempo en esclarecerse la estructura. La estructura del motivo hélice-giro-hélice sólo se puede ver cuando la proteína está unida al ADN. Hoy se conocen muchos ejemplos de esas interacciones, donde la estructura estable de la proteína se altera en forma importante por unión con un ligando. En presencia de inductores, como alolactosa o IPTG, el represor adopta una conformación un poco distinta, y ya no puede unirse a operadores de ADN.

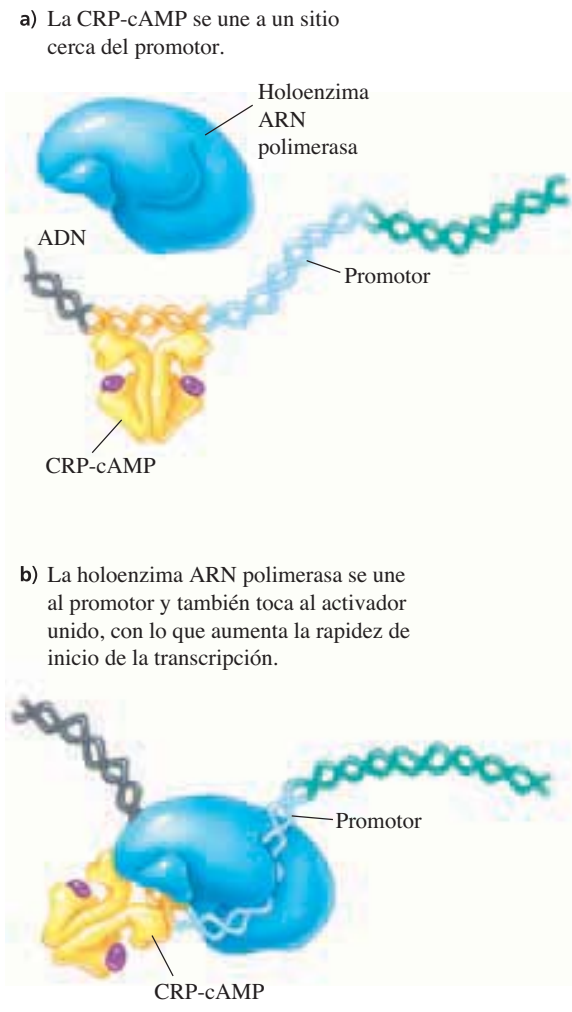
C. Activación de la transcripción por la proteína reguladora cAMP

La transcripción del operón *lac* en *E. coli* no sólo depende de la presencia de los β-galactósidos, sino también de la concentración de glucosa en el medio externo. El operón *lac* se transcribe en forma máxima cuando los β-galactósidos, como la lactosa, son la única fuente de carbono; la transcripción se reduce 50 veces cuando también hay glucosa presente. La menor velocidad de la transcripción de operones cuando está presente la glucosa se llama represión por catabolito.

La represión por catabolito es una propiedad de muchos operones que codifican enzimas metabólicas. En forma característica, esos operones tienen promotores débiles, de donde se inicia la transcripción en forma ineficiente en presencia de glucosa. Sin embargo, en ausencia de glucosa, la velocidad de inicio aumenta en forma notable, debido a un activador que convierte el promotor relativamente débil en uno más fuerte. No

interviene represor alguno, a pesar del término *represión por catabolito*. De hecho, este es un ejemplo bien estudiado de un mecanismo de activación.

El activador es una proteína cíclica AMP reguladora (o receptora) (CRP, *cyclic regulatory protein*), que también se conoce como proteína activadora de catabolito (CAP, *catabolite activator protein*). La CRP es una proteína dimérica cuya actividad es modulada por el AMP cíclico. En ausencia del cAMP, la CRP tiene poca afinidad por el ADN, pero cuando hay cAMP, se une a la CRP y la convierte en una proteína de unión con secuencia específica en el ADN. El complejo CRP-cAMP interactúa con secuencias específicas del ADN cerca de los promotores de más de 30 genes, incluyendo al operón *lac*. Como el genoma contiene muchos sitios de unión más para la CRP-cAMP que para el represor *lac*, no es de sorprender que haya al menos 1 000 moléculas de la CRP por célula, en comparación con sólo unas 10 moléculas del represor *lac*. Con frecuencia los sitios de unión con la CRP-cAMP están justo arriba (hacia el extremo 5′) de las regiones –35 en los promotores que activan. Mientras está unido al ADN, el complejo de la CRP-cAMP puede tocar la ARN polimerasa en el sitio promotor, causando mayores tasas de inicio de transcripción (figura 21.20). La mayor parte de las interacciones proteína-proteína son entre la CRP-cAMP enlazado y las subunidades α de la ARN polimerasa. Eso es típico de la mayor parte de las interacciones entre activadores y la ARN polimerasa. (Hay muchos activadores distintos de transcripción en las células bacterianas). El efecto neto de la CRP-cAMP es aumentar la producción de enzimas que puedan usar sustratos que no sean glucosa. En el caso del operón *lac*, sólo hay activación por la CRP-cAMP cuando hay β-galactósidos disponibles; en otras ocasiones se reprime la transcripción del operón.



◀Figura 21.20
Activación del inicio de la transcripción en el promotor *lac* por la proteína CRP-cAMP. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

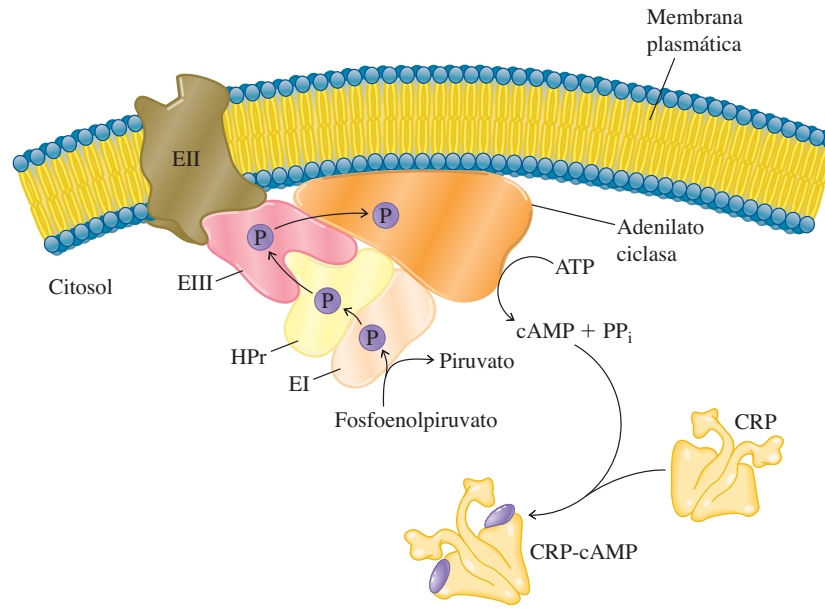


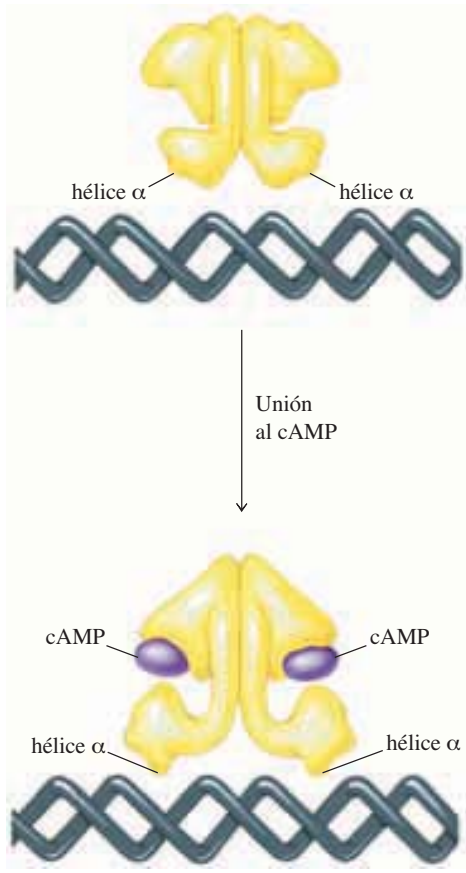
Figura 21.21 ▶
Producción del cAMP. En ausencia de glucosa, la enzima III (EIII) transfiere un grupo fosforilo, que se origina en fosfoenolpiruvato, a adenilato ciclasa, unida a la membrana. La adenilato ciclasa fosforilada cataliza la conversión de ATP en cAMP. La cAMP se une a la CRP y la combinación CRP-cAMP activa la transcripción de una cantidad de genes codificadores de enzimas que compense la falta de glucosa como fuente de carbono.

En *E. coli*, la concentración del cAMP dentro de la célula está controlada por la concentración de glucosa en el exterior de la célula. Cuando hay disponible glucosa, se importa en la célula y se fosforila mediante un complejo de proteínas de transporte que tienen el nombre colectivo de sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato. Cuando no hay glucosa disponible, una de las enzimas de transporte de glucosa, la enzima III, cataliza la transferencia de un grupo fosforilo, que proviene, en último término, del fosfoenolpiruvato a la adenilato ciclasa y provoca su activación (figura 21.21). La adenilato ciclasa (que también se llama adenilil ciclasa) cataliza entonces la conversión de ATP a cAMP, y con ello aumenta las concentraciones del cAMP en la célula. Cuando se producen moléculas de cAMP, se unen a la CRP y estimulan el inicio de la transcripción en promotores que responden a la represión por catabolito. En los eucariotas funcionan mecanismos similares para responder a estímulos externos, y allí las moléculas como las de cAMP actúan como segundos mensajeros (sección 9.12B).

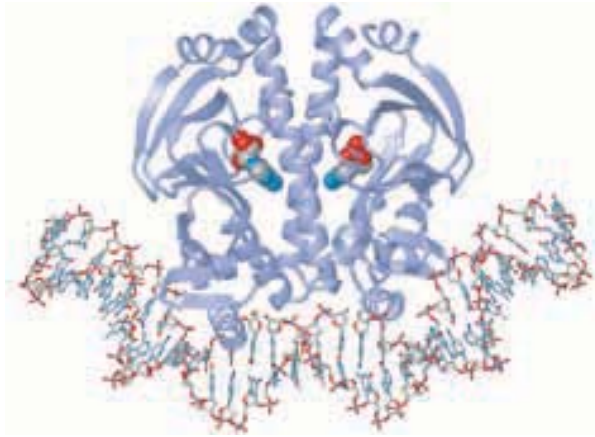
Cada subunidad del dímero CRP contiene un motivo de unión con el ADN de hélice-giro-hélice. En presencia del cAMP entran dos hélices, una de cada monómero, en secciones adyacentes del surco mayor del ADN y se ponen en contacto con los nucleótidos del sitio de unión con la CRP-cAMP. Es la misma estrategia de enlace que usa el represor *lac* y la *Eco*RI. En ausencia del cAMP, la conformación de la CRP cambia de tal modo que las dos hélices α ya no se pueden unir al surco mayor (figura 21.22). Cuando la CRP-cAMP se enlaza a la secuencia de activador, el ADN se flexiona un poco para conformarse a la superficie de la proteína (figura 21.23).

21.8 Modificación postranscripcional del ARN

En muchos casos, los ARN transcritos deben alterarse en forma extensa para adoptar sus estructuras y funciones maduras. Esas alteraciones caen en tres categorías generales: 1) eliminación de nucleótidos de los transcritos primarios del ARN; 2) adición de los nucleótidos con secuencias no codificadas por los genes correspondientes, y 3) modificación covalente de ciertas bases. Las reacciones que transforman un transcrito primario del ARN en una molécula madura de ARN tienen el nombre colectivo de **procesamiento de ARN**. El procesamiento de ARN es básico para la función de la mayor parte de las moléculas de ARN, y es parte integrante de la expresión genética.



◀Figura 21.22
Cambios de conformación en la proteína C reactiva (CRP) causados por la unión con cAMP. Cada monómero del dímero de la CRP contiene un motivo de vuelta de hélice. En ausencia de la cAMP, las hélices α no pueden caber en secciones adyacentes del surco mayor del ADN, y no pueden reconocer al sitio de unión de la CRP-cAMP. Cuando la cAMP se une a la CRP, las dos hélices α asumen la conformación adecuada para unirse al ADN.

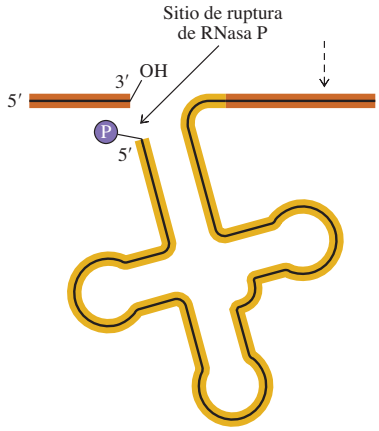


◀Figura 21.23
Estructura de un complejo entre la CRP-cAMP y el ADN. Las dos subunidades contienen una molécula de cAMP unida en el sitio alostérico. Cada subunidad tiene una hélice α en posición del surco mayor del ADN, en el sitio de unión con la CRP-cAMP. Nótese que el enlazamiento induce una pequeña flexión en el ADN. [PDB 1CGP]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

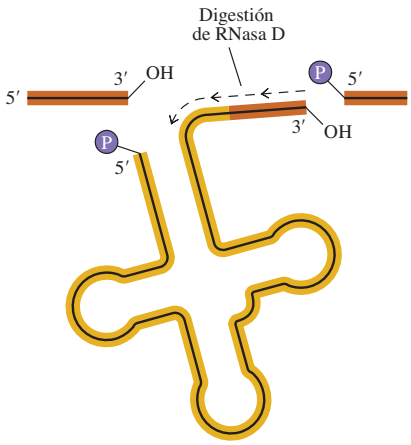
A. Procesamiento de ARN de transferencia

Las moléculas maduras de ARNt se generan en los eucariotas y en los procariotas mediante el procesamiento de transcritos primarios. En los procariotas, el transcrito primario contiene con frecuencia varios ARNt precursores. Esos precursores se desprenden de los transcritos primarios grandes, y las ribonucleasas, o RNasas, los recortan hasta sus longitudes maduras. La figura 21.24 es un resumen del procesamiento de los ARNt precursores procarióticos.

a) La RNasa P y otras endonucleasas rompen al transcrito primario.



b) RNAsa D recorta el extremo 3′.



c) La ARNt nucleotidil transferasa adiciona CCA al extremo 3′.

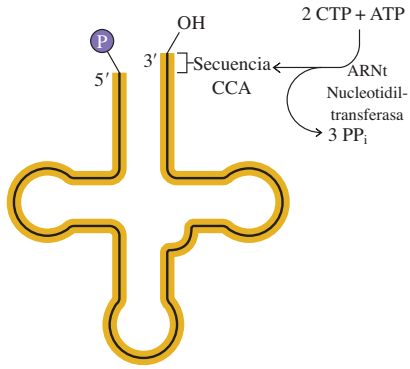


Figura 21.24 ▲
Resumen del procesamiento procariótico de ARNt.

La enconucleasa RNasa P cataliza la separación inicial de la mayor parte de transcritos primarios de ARNt. La enzima rompe al transcrito en el lado 5′ de cada secuencia del ARNt, y libera precursores monoméricos de ARNt con extremos 5′ maduros. La digestión *in vivo* con RNasa P es rápida, y se efectúa mientras se está sintetizando el transcrito.

La RNasa P fue una de las primeras ribonucleasas específicas que se estudiaron con detalle, y se conoce mucho acerca de su estructura. En realidad, la enzima es una ribonucleoproteína. En *E. coli*, está formada por una molécula de ARN con 377 nucleótidos (M_r = 130 000), y un polipéptido pequeño (M_r = 18 000). En ausencia de la proteína, el componente de ARN es catalíticamente activo *in vitro* (bajo ciertas condiciones). Fue una de las primeras moléculas de ARN cuya actividad enzimática se demostró, y es ejemplo de la cuarta clase de moléculas de ARN descritas en la sección 21.1. La proteína componente de la RNasa P ayuda a mantener la estructura tridimensional del ARN.

Otras endonucleasas separan a los ARNt precursores cerca de su extremo 3′. El posterior procesamiento del extremo 3′ de un ARNt precursor requiere la actividad de una exonucleasa, como la RNasa D. Esta enzima cataliza la eliminación consecutiva de los nucleótidos del extremo 3′ en un ARNt precursor monomérico, hasta llegar al extremo 3′ del ARNt.

Para que funcionen bien, todas las moléculas de ARNt, tanto procarióticas como eucarióticas, deben tener la secuencia CCA en su extremo 3′. En algunos casos, esos nucleótidos se agregan después de la transcripción, luego que se hayan completado todos los demás tipos de procesamiento en el extremo 3′. La adición de nucleótidos es catalizada por la ARNt nucleotidiltransferasa, y es uno de los pocos ejemplos de la adición de nucleótidos que no están codificados por un gen.

La modificación covalente de los nucleótidos también es parte del procesamiento del ARNt. Las moléculas maduras de ARNt tienen mayor diversidad de modificaciones covalentes que cualquier otra clase de molécula de ARN. De los casi 80 nucleótidos en una molécula de ARNt, 26 a 30 están modificados en forma covalente. Cada tipo de modificación covalente suele presentarse sólo en un lugar en cada molécula. En la figura 21.25 se muestran algunos ejemplos de los sitios de modificación en los nucleótidos.

B. Procesamiento de ARN ribosómico

Las moléculas de ARN ribosómico en todos los organismos se producen en forma de grandes transcritos primarios que requieren posterior procesamiento, el cual incluye metilación y separación por endonucleasas para que las moléculas maduras puedan adoptar su forma activa. Este procesamiento de ARN ribosómico se acopla al ensamble de ribosomas.

Los transcritos primarios de moléculas de ARNr procarióticas tienen un tamaño aproximado de 30S y contienen una copia de los ARNr 16S, 23S y 5S. Los transcritos también contienen precursores de ARNt dispersos. (Nótese que S es el símbolo de la unidad Svedberg, medida de la velocidad con la que las partículas se mueven en el campo gravitacional que se desarrolla en una ultracentrífuga. Los grandes valores de S se asocian a masas grandes. La relación entre S y la masa no es lineal y en consecuencia los valores de S no son aditivos.) Ya que los tres ARNr se derivan de un solo transcrito, este procesamiento asegura que haya cantidades equimolares de cada uno de los ARN ribosómicos maduros.

Los extremos 5′ y 3′ de las moléculas maduras de los ARNr se suelen encontrar en regiones de bases apareadas en el transcrito primario. En los procariotas, la endonucleasa RNasa III se une a esas regiones y rompe al precursor cerca de los extremos de los ARNr 16S y 23S. Después de la separación inicial, los extremos de las moléculas de ARNr son recortados por las acciones de endonucleasas específicas (figura 21.26).

Los ARN ribosómicos eucarióticos también se producen en el procesamiento de precursores mayores. Los transcritos primarios tienen tamaños entre 35S y 47S, y contienen una copia de cada una de tres especies eucarióticas de ARNr: 18S, 5.8S y 28S. (El cuarto ARNr eucariótico es 5S ARNr, y la ARN polimerasa III lo transcribe como monómero, que se procesa por separado). Los transcritos primarios se sintetizan en la región del núcleo llamada nucleolo, donde sucede el procesamiento inicial. Cada ARNr precursor se enrolla parcialmente y se une a algunas de sus proteínas ribosómicas compañeras para que sucedan las rupturas de procesamiento.

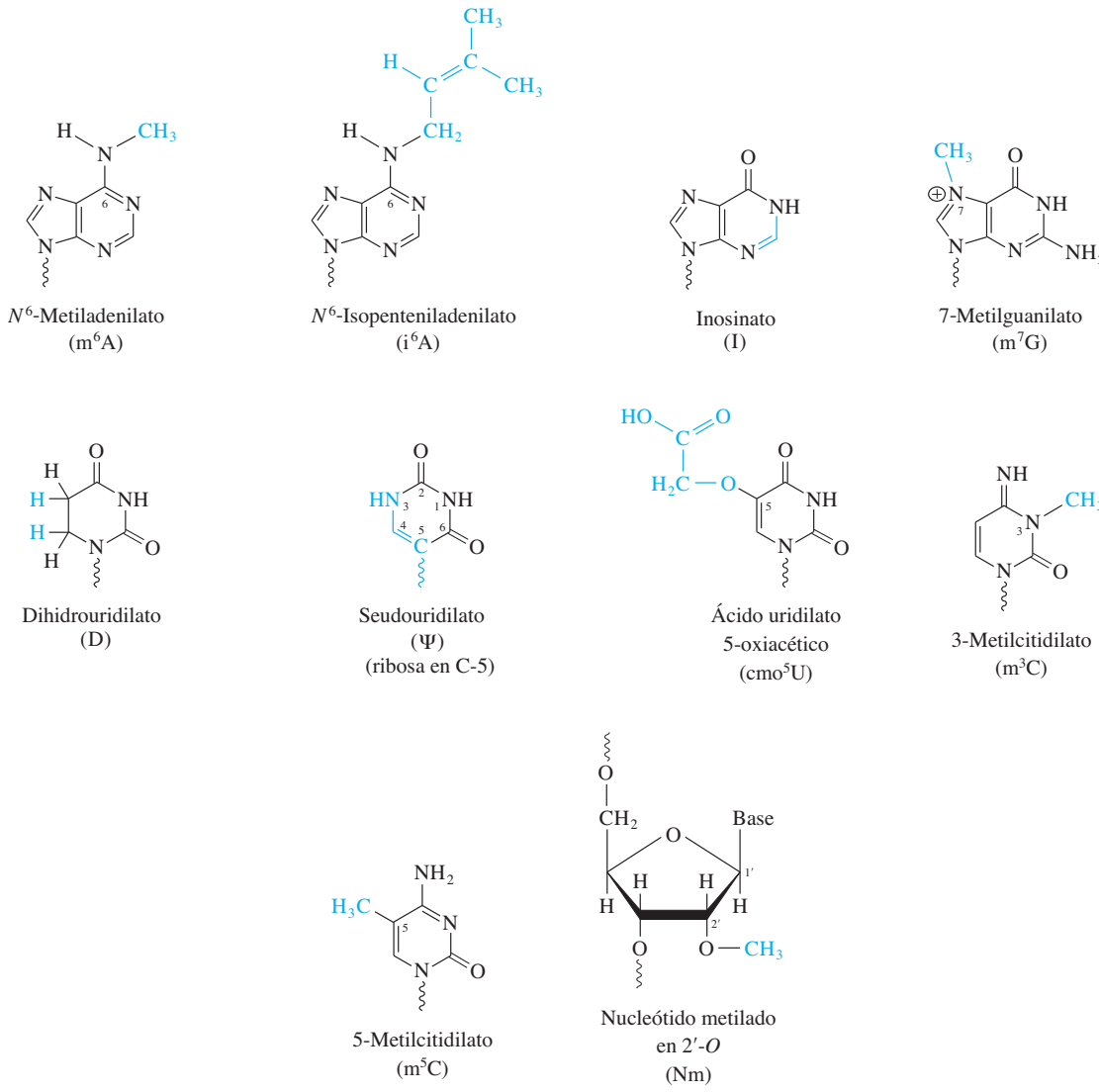
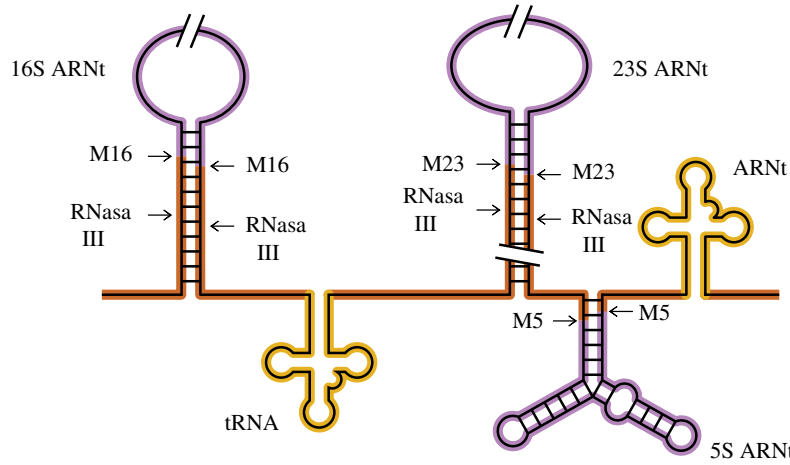


Figura 21.25 ▲
Ejemplos de modificaciones covalentes encontradas en moléculas de los ARNt. Las modificaciones se indican en gris.



◀Figura 21.26
Escisión endonucleolítica de precursores de ARN ribosómico en *E. coli*. El transcrito primario contiene una copia de cada uno de los ARN ribosómicos, y también puede contener varios precursores de ARNt. Los precursores grandes ARNr se rompen a partir del transcrito primario grande, por acción de la RNasa III. Los extremos de los ARNr 16S, 23S y 5S se recortan por acción de las endonucleasas M16, M23 y M5, respectivamente. (Las marcas inclinadas indican las partes del transcrito primario de los ARNr que se han omitido, para mayor claridad).

21.9 Procesamiento de ARNm eucariótico

El procesamiento de precursores de los ARNm es una de las funciones bioquímicas que distinguen a los procariotas de los eucariotas. En los procariotas, los ARNm transcritos primarios se traducen en forma directa y con frecuencia la traducción se inicia antes de terminar la transcripción. Por otra parte, en los eucariotas la transcripción sucede en el núcleo y la traducción en el citoplasma. Esta compartimentalización de funciones en las células eucarióticas permite el procesamiento nuclear de precursores de los ARNm sin interrumpir la traducción.

Las moléculas maduras de los ARNm eucariótico se derivan con frecuencia de transcritos primarios mucho más grandes. El posterior procesamiento de esos transcritos primarios incluye algunos de los mismos pasos que se vieron en la sección anterior, que son: separación de un precursor, adición de nucleótidos terminales y modificación covalente de los nucleótidos. Con frecuencia, los nucleótidos específicos de la parte media de un ARNm primario transcrito en realidad se escinden o eliminan, y los fragmentos que resultan se ligan entre sí para producir el ARNm maduro. Este paso se llama **corte y empalme** o **empalme**, y es común en la mayor parte de las especies eucarióticas. También el empalme se presenta durante el procesamiento de algunos ARNt y ARNr precursores, aunque el mecanismo difiere del de corte y empalme de ARNm precursores.

A. Extremos modificados en las moléculas eucarióticas de ARNm

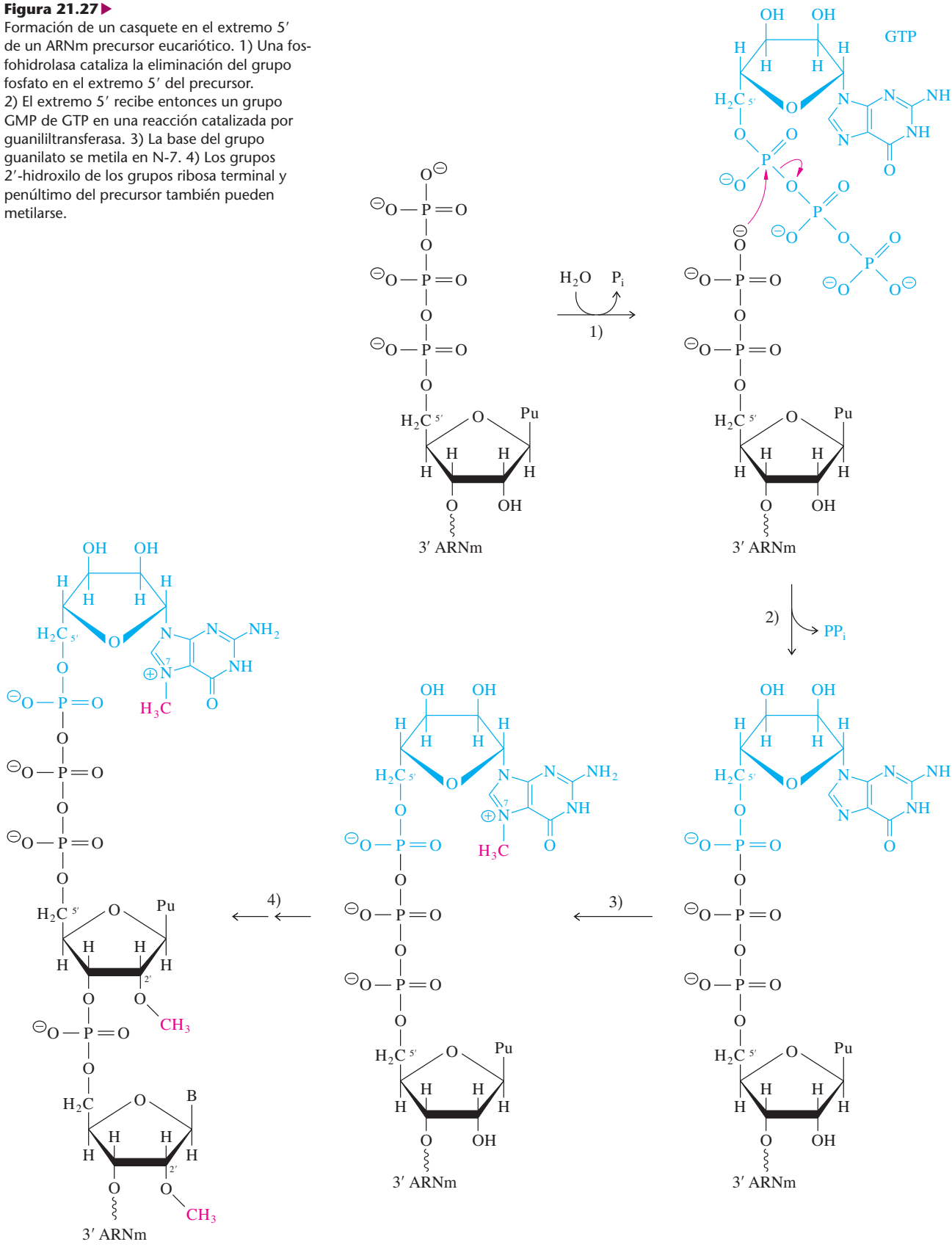
Todos los ARNm precursores eucarióticos sufren modificaciones que aumentan la estabilidad de los ARNm maduros, y los hacen mejores sustratos para la traducción. Una forma de aumentar la estabilidad de los ARNm es modificar sus extremos, para que ya no sean susceptibles a exonucleasas celulares que degraden al ARN.

Los extremos 5′ se modifican mientras todavía se están sintetizando los ARNm precursores. El extremo 5′ del transcrito primario es un residuo de nucleósido trifosfato (por lo general una purina) que fue el primer nucleótido que incorporó la ARN polimerasa II. La modificación de este extremo comienza cuando el grupo fosfato terminal es eliminado por acción de una fosfohidrolasa (figura 21.27). El grupo 5′-difosfato que resulta reacciona entonces con el átomo de fósforo α de una molécula de GTP, para formar un enlace de trifosfato 5′-5′. Esta reacción es catalizada por la guanililtransferasa, y produce una estructura llamada **casquete**. Muchas veces se modifica después el casquete, metilando el guanilato recién añadido. Los grupos 2′-hidroxilo de los dos primeros nucleótidos en el transcrito original también se pueden metilar. Los grupos metilo para esas reacciones provienen de la *S*-adenosilmetionina (sección 7.3).

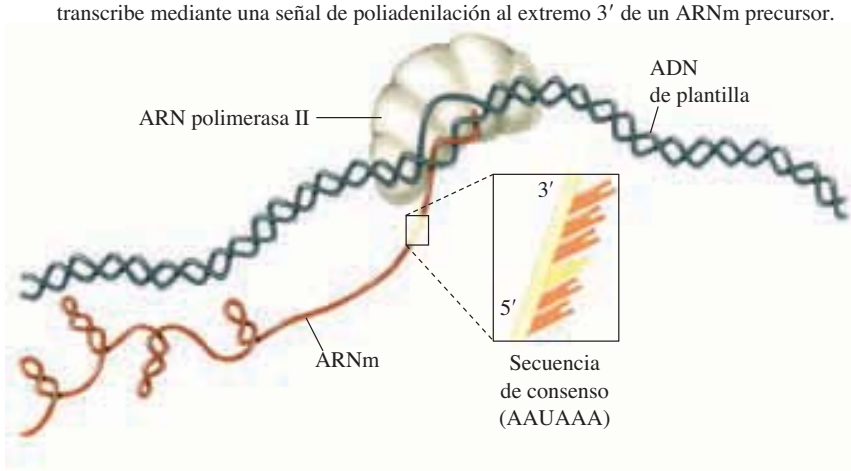
El enlace de trifosfato 5′-5′ protege a la molécula de ARNm contra 5′ exonucleasas, porque bloquea su extremo 5′. El casquete también convierte ARNm precursores en sustratos para otras enzimas procesadoras en el núcleo, como las que catalizan los empalmes. En el ARNm maduro, el casquete es el sitio donde se fijan los ribosomas durante la síntesis de proteínas. El proceso de casquete es cotranscripcional que se confina al núcleo. Las enzimas de encasquetado se ven en la figura 21.27, e interactúan en forma directa con complejos de transcripción de la ARN polimerasa II, pero no con complejos de la ARN polimerasa I o la ARN polimerasa III, con lo que se asegura que los ARNm precursores sean los únicos ARN encasquetados (es decir, que los ARNt y los ARNr no son sustratos para encasquetado).

Los ARNm precursores eucarióticos también se modifican en sus extremos 3′. Una vez que la ARN polimerasa II ha transcrito pasando por el extremo 3′ de la región codificante del ADN, una endonucleasa separa al ARN recién sintetizado hacia el extremo 3′ de un sitio específico, cuya secuencia de reconocimiento de consenso es AAUAAA. Esta secuencia se une por un factor de especificidad de ruptura y poliadenilación (CPSF, *cleavage and polyadenylation specificity factor*), proteína que también interactúa con la endonucleasa y una polimerasa (figura 21.28, página 676). Después de separar el ARN, la endonucleasa se disocia y se agregan varios residuos de adenilato al extremo de la molécula 3′, recién generado. Las reacciones de adición son catalizadas por la poli A polimerasa, que adiciona residuos de adenilato usando ATP como sustrato. Se pueden agregar hasta 250 nucleótidos para formar un tramo de poliadenilato llamado **cola poli A**.

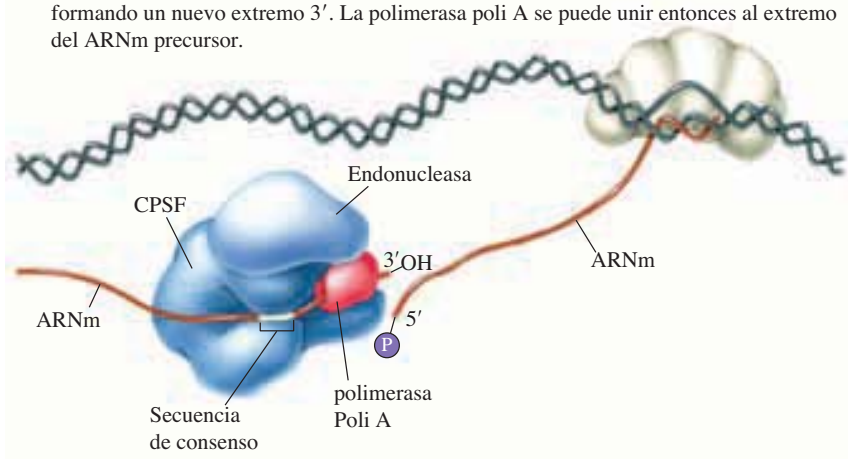
Figura 21.27 ▶
Formación de un casquete en el extremo 5′ de un ARNm precursor eucariótico. 1) Una fosfohidrolasa cataliza la eliminación del grupo fosfato en el extremo 5′ del precursor. 2) El extremo 5′ recibe entonces un grupo GMP de GTP en una reacción catalizada por guanililtransferasa. 3) La base del grupo guanilato se metila en N-7. 4) Los grupos 2′-hidroxilo de los grupos ribosa terminal y penúltimo del precursor también pueden metilarse.



a) La poliadenilación comienza cuando el complejo de transcripción de la ARN polimerasa II transcribe mediante una señal de poliadenilación al extremo 3′ de un ARNm precursor.



b) El CPSF se une a la secuencia de consenso y forma un complejo que contiene una ARN endonucleasa. La endonucleasa cataliza la ruptura del transcrito en dirección 3′ de la secuencia de poliadenilación, formando un nuevo extremo 3′. La polimerasa poli A se puede unir entonces al extremo del ARNm precursor.



c) La endonucleasa se disocia y el nuevo extremo 3′ del ARN se poliadenila por actividad de la polimerasa poli A

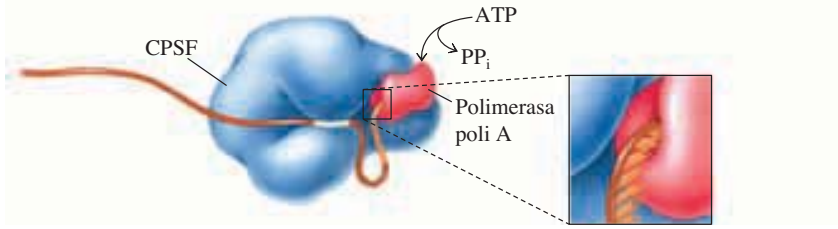


Figura 21.28 ▲
Poliadenilación de un ARNm precursor eucariótico. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

Con unas pocas excepciones, todas las moléculas maduras de los ARNm en los eucariotas contienen colas poli A. La longitud de la cola varía, dependiendo de la especie y quizá del tipo de ARNm y de la etapa de desarrollo de la célula. La longitud depende también de la edad del ARNm, ya que la cola poli A se acorta en forma progresiva por acción de 3′-exonucleasas. De hecho, ya la cola se ha acortado en 50 a 100 nucleótidos para cuando el ARNm maduro llega a los poros nucleares. La presencia de la cola poli A aumenta el tiempo que requieren las exonucleasas para llegar a la región codificante.

B. Empalme de algunos ARNm precursores eucarióticos

En los procariotas es raro el corte y empalme, pero en los vertebrados y las plantas de flor es la regla. Las secuencias internas que se separan del ARN transcrito primario se llaman **intrones**. Las secuencias que existen en el ARN transcrito primario y en la molécula madura de ARN se llaman **exones**. Las palabras *intrón* y *exón* también se refieren a las regiones del gen (ADN) que codifican los ARN intrones y exones correspondientes. Ya que los ADN intrones se transcriben, se consideran parte del gen. Las uniones de intrones y exones se conocen como **sitios de empalme**, porque son los sitios donde se cortan y empalman los ARNm precursores.

Debido a la pérdida de los intrones, con frecuencia el ARNm maduro es una fracción del tamaño del transcrito primario. Por ejemplo, el gen de la triosa fosfato isomerasa del maíz contiene nueve exones y ocho intrones, y abarca 3 400 pb de ADN. El ARNm maduro, que incluye una cola de poli A, sólo tiene 1 050 nucleótidos de longitud (figura 21.29). La enzima misma contiene 253 residuos de aminoácido.

Se creía que había alguna correlación entre la organización de intrones/exones en un gen y la estructura de la proteína que codifica el gen. De acuerdo con esta hipótesis,

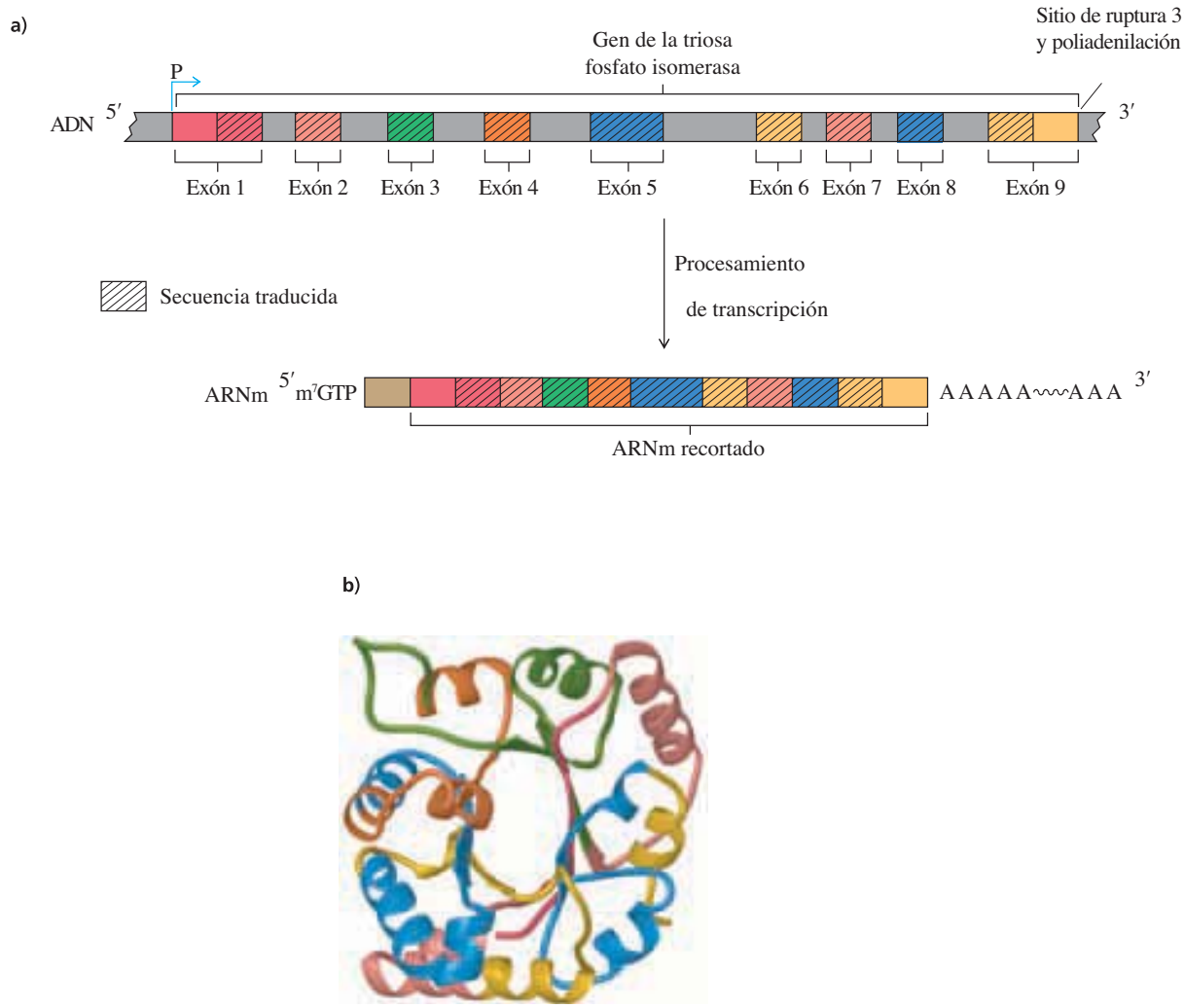


Figura 21.29 ▲
Gen de la triosa fosfato isomerasa de maíz y la enzima codificada. **a)** Diagrama del gen mostrando nueve exones y ocho intrones. Algunos exones contienen secuencias traducidas y no traducidas. **b)** Estructura tridimensional de la proteína que muestra sus partes codificadas por cada exón. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

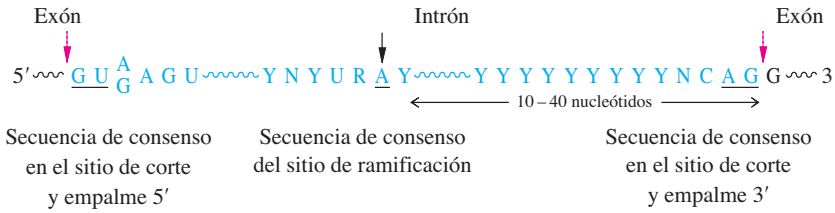


Figura 21.30 ▶
Secuencias de consenso en sitios de corte y empalme en vertebrados. Los nucleótidos muy conservados están subrayados; Y representa una pirimidina (U o C), R representa una purina (A o G) y N representa cualquier nucleótido. Los sitios de empalme, donde se recorta y une el ARN precursor, se indican con flechas punteadas, y el sitio de ramificación se indica con una flecha negra. El intrón se destaca en gris.

los exones codifican dominios de proteína y la presencia de intrones refleja la organización primitiva del gen. En otras palabras, los intrones surgieron temprano en la evolución. Sin embargo, como se ve en la figura 21.29b, no hay una correlación obvia entre los exones y la estructura de la proteína. La mayoría de los bioquímicos y biólogos moleculares cree hoy que los intrones han sido insertados en lugares aleatorios durante la evolución de un gen. La hipótesis de "intrones tarde" establece que la mayor parte de los genes primitivos no tenían intrones, y postula que los intrones surgieron mucho después, durante la evolución de los eucariotas.

La longitud de los intrones puede variar desde 42 pb hasta 10 000 pb (el límite inferior varía con cada especie; por ejemplo, la mayor parte de los intrones en *C. elegans* son demasiado pequeños para poderse empalmar con exactitud, ya sea en una célula de vertebrado o en un extracto sin células). Las secuencias de nucleótido en los sitios de empalme son parecidas en todos los ARNm precursores, pero la secuencia del resto del intrón no se conserva. En la figura 21.30 se ven las secuencias de consensos en los dos sitios de empalme en los vertebrados. Otra secuencia corta de consenso se encuentra dentro del intrón, cerca del extremo 3′. Esta secuencia se conoce como **sitio de ramificación,** o secuencia de punto de ramificación; también tiene un papel importante en el corte y empalme.

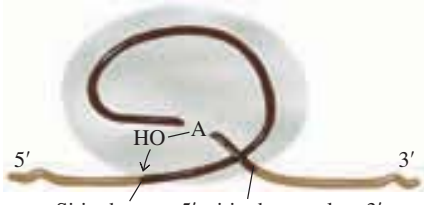
El empalme de los ARNm precursores requiere dos reacciones de transesterificación, una entre el sitio de empalme 5′ y el residuo de adenilato en el sitio de ramificación, y uno entre el exón 5′ y el sitio de empalme 3′. Los productos de esas dos reacciones son: 1) los exones unidos y 2) el intrón escindido en forma de una molécula en forma de lazo o gaza. Estas reacciones de corte y empalme son catalizadas por un complejo proteínico grande de ARN llamado **espliceosoma** (de *splice*, "corte y empalme"). El espliceosoma ayuda no sólo a conservar los productos intermedios del empalme, sino también a colocar los sitios de empalme para que los exones puedan unirse con precisión (figura 21.31).

El espliceosoma es un complejo grande de varias subunidades. Contiene más de 100 proteínas y 5 moléculas de ARN, cuya longitud total es 5 000 nucleótidos, más o menos. A esas moléculas de ARN se les llama ARN nuclear pequeño (snARN; *small nuclear,* nuclear pequeño) y se asocian a proteína para formar ribonucleoproteínas nucleares pequeñas o snRNP. Las snRNP tienen importancia no sólo en el corte y empalme de ARNm precursores, sino también en otros procesos celulares.

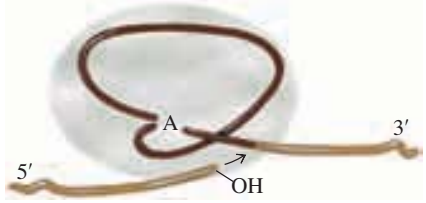
Hay cinco tipos diferentes de snARN: U1, U2, U4, U5 y U6. (U es por uracilo, una base común en estas moléculas pequeñas de ARN) y un núcleo diploide de vertebrado contiene más de 100 000 copias de snARN en total. Las cinco moléculas de snARN están apareadas extensamente con bases, y contienen nucleótidos modificados. Cada snRNP contiene uno o dos snRNP más cierta cantidad de proteínas. Algunas de esas proteínas son comunes a todos los snRNP; otras se encuentran sólo en una clase de snRNP.

Se han hecho experimentos bioquímicos *in vitro* usando componentes purificados, que llevan al modelo de ensamble secuencial de espliceosoma (figura 21.32). La formación de un espliceosoma comienza cuando un snRNP U1 se une al sitio de empalme 5′ recién sintetizado en el ARNm precursor. Esta interacción depende del apareamiento de bases entre el sitio de empalme 5′ y una secuencia complementaria cercana al extremo 5′ del snARN U1. Entonces, un snRNP U2 se une al sitio de ramificación del intrón y forma un complejo estable que cubre unos 40 nucleótidos. Después, un snRNP U5 se asocia al sitio de empalme 3′. Por último, un snRNP U4/U6 se une al complejo y todos los snRNP se juntan para formar el espliceosoma. Como ahora hay varios grupos que descubrieron que esos mismos snRNP se encuentran pre-ensamblados en un complejo

a) El espliceosoma coloca al residuo de adenilato en posición, en el sitio de ramificación cerca del sitio de corte 5′. El grupo 2′-hidroxilo del adenilato ataca al sitio de empalme 5′.



b) El grupo 2′-hidroxilo se fija al extremo 5′ del intrón y el grupo 3′-hidroxilo recién creado del exón ataca al sitio de empalme 3′.



c) La consecuencia es que se unen los extremos de los exones, y se desprende el intrón, una molécula en forma de lazo.

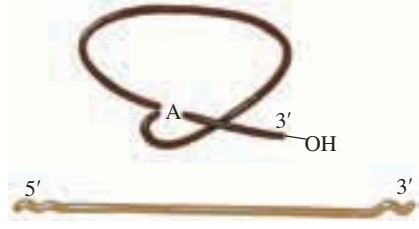
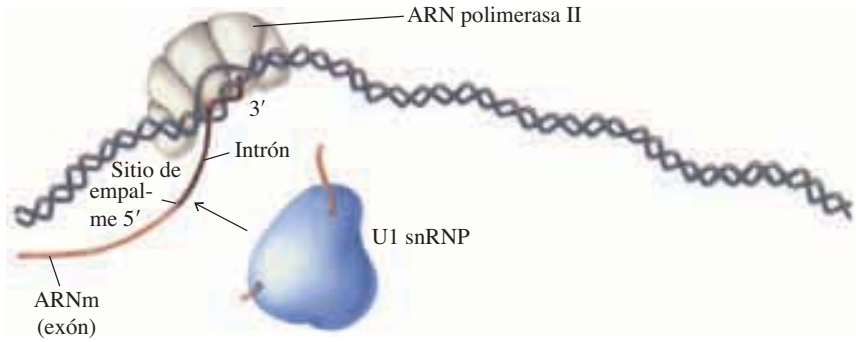
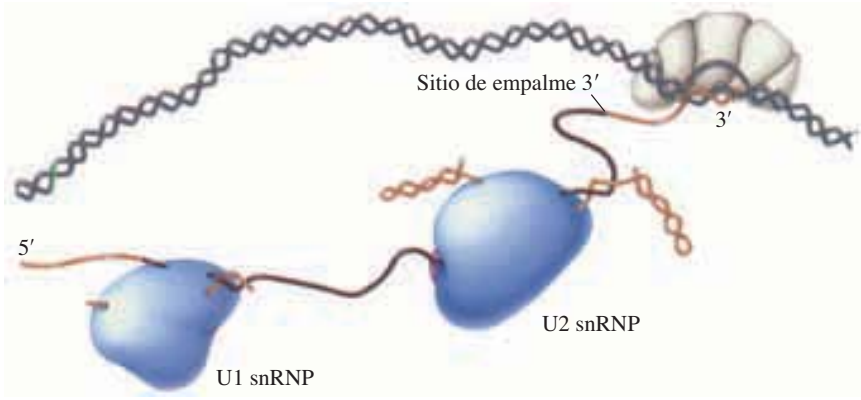


Figura 21.31 ▲
Eliminación de intrón en precursores de los ARNm. El espliceosoma es un complejo de ARN-proteína de varios componentes, y cataliza el empalme. [Adaptado de Sharp, P. A. (1987). Splicing of messenger RNA precursors. *Science* 235:766-771]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

a) Tan pronto como el sitio de empalme 5′ sale del complejo de transcripción, una U1 snRNP se une a él.



b) A continuación se une una U2 snRNP al sitio de ramificación dentro del intrón.



c) Cuando sale el sitio de empalme 3′ del complejo de transcripción, se le une una U5 snRNP y se ensambla el espliceosoma completo en torno a una U4/U6 snRNP.

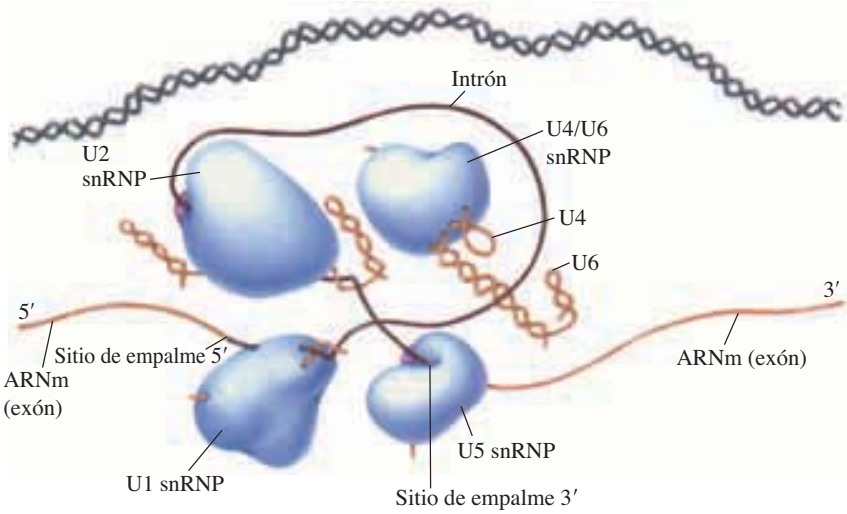


Figura 21.32 ▲
Formación de un espliceosoma. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

mucho mayor, antes de la operación de empalme, puede ser que esta ruta no refleje bien el ciclo de corte y empalme *in vivo*.

La unión de los snRNP U1, U2 y U5 a las secuencias de consenso en el sitio 5′, sitio de ramificación y sitio de empalme 3′, coloca en posición correcta a esos tres sitios interactivos para la reacción de corte y empalme. Entonces, el espliceosoma evita que el exón 5′ se difunda alejándose después del empalme, y lo posiciona para que se una al exón 3′. Una vez formado un espliceosoma en un intrón, es muy estable y puede purificarse de los extractos celulares.

Ya que los espliceosomas se pueden observar en transcritos nacientes, se cree que la eliminación de intrones es el paso que limita la velocidad de empalme. Como el espliceosoma, que es casi tan grande como un ribosoma, es demasiado grande para entrar por los poros nucleares, los ARNm precursores no pueden salir del núcleo antes de que se termine el procesamiento. Una vez que el intrón se escinde del espliceosoma se recicla, y repite el ciclo catalítico en el siguiente intrón que encuentre.

Resumen

1. Un gen es una secuencia de ADN que se transcribe. Los genes domésticos codifican proteínas y moléculas de ARN que son esenciales para las actividades celulares normales.

2. Las células contienen varios tipos de ARN, como el ARN de transferencia, el ARN ribosómico, el ARN mensajero y moléculas pequeñas de ARN.

3. La síntesis del ARN dirigida por ADN se llama transcripción y es catalizada por la ARN polimerasa. Se agregan ribonucleósido trifosfatos en reacciones de transferencia de grupo nucleotidilo usando una hebra de ADN como plantilla.

4. La transcripción comienza en una secuencia promotora y prosigue en dirección 5′ ⟶ 3′. Una secuencia de consenso en el promotor indica los nucleótidos que se encuentran con más frecuencia en cada posición. La subunidad σ de la ARN polimerasa en *E. coli* aumenta la afinidad de la polimerasa central hacia un promotor, y disminuye la afinidad hacia secuencias no promotoras. Durante el inicio se forma una burbuja de transcripción y se sintetiza un tramo corto de ARN. La subunidad σ se disocia en la transición de inicio a elongación de cadena.

5. La terminación de la transcripción en *E. coli* ocurre cerca de sitios de pausa, cuando el ARN forma una estructura en horquilla. Algunas terminaciones requieren una proteína rho, que se une al ARN de una hebra.

6. En los eucariotas, varias y distintas ARN polimerasas efectúan la transcripción. Los factores de transcripción interactúan con el promotor y la ARN polimerasa para iniciar la transcripción.

7. Algunos genes se expresan en forma constitutiva, pero la transcripción de otros genes es regulada. La transcripción puede estar regulada por un represor o un activador, que con frecuencia son proteínas alostéricas.

8. La transcripción de los tres genes del operón *lac* se bloquea cuando el represor *lac* se une a dos operadores cerca del promotor. El represor se disocia del ADN cuando se une a la alolactosa inductora. La transcripción es activada por un complejo de cAMP y CRP (proteína cAMP reguladora).

9. Con frecuencia, los ARN transcritos se modifican por procesamiento, lo que comprende remoción, adición o modificación de residuos de nucleótido. Los transcritos primarios de ARNt y ARNr procariótico se procesan por escisión nucleolítica y por modificación covalente.

10. El procesamiento de los ARNm en los eucariotas comprende la adición de un casquete 5′ y una cola poli A 3′ para proteger la molécula contra su digestión por la nucleasa. En algunos casos los intrones se eliminan por corte y empalme. Las dos reacciones de transesterificación en el corte y empalme son catalizadas por el espliceosoma, que es un complejo que contiene ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNP).

Problemas

1. Una ARN polimerasa bacteriana alarga el ARN con una rapidez de 70 nucleótidos por segundo, y cada complejo de transcripción contiene 70 pb de ADN.
   a) ¿Cuál es la cantidad máxima de moléculas de ARN que pueden producirse por minuto de un gen con 6 000 pb? (Suponga que el inicio no es limitante de la velocidad).
   b) ¿Cuál es la cantidad máxima de complejos de transcripción que pueden unirse a este gen en una vez?

2. El genoma de *E. coli* tiene un tamaño aproximado de 4 600 kb, y contiene unos 4 000 genes. El genoma de los mamíferos tiene un tamaño aproximado de 3×10^6 kb y contiene cuando mucho 50 000 genes. Un gen de *E. coli* tiene una longitud promedio de 1 000 pb.
   a) Calcule el porcentaje de ADN de *E. coli* que no se transcribe.
   b) Aunque muchos genes de los mamíferos son más grandes que los genes bacterianos, la mayor parte de los pro-

ductos genéticos de los mamíferos son de igual tamaño que los productos bacterianos. Calcule el porcentaje de ADN en exones en el genoma de los mamíferos.

3. Hay varios métodos que permiten introducir un gen eucariótico intacto (por ejemplo, el gen de triosa fosfato isomerasa) en una célula procariótica (véase el capítulo 23). ¿Espera usted que este gen se transcriba en forma correcta por la ARN polimerasa procariótica? Y en la situación inversa, donde un gen procariótico intacto se introduce en una célula eucariótica, ¿se transcribirá bien con el complejo de transcripción eucariótico?

4. Suponga que, en un caso raro, un gen típico eucariótico de la triosa fosfato isomerasa contiene las secuencias correctas para permitir la transcripción exacta en una célula procariótica. El ARN resultante ¿se traducirá en forma correcta para formar la enzima intacta?

5. Describa cómo se afecta la velocidad de transcripción del operón *lac* cuando las células de *E. coli* crecen en presencia de: a) lactosa más glucosa, b) sólo glucosa y c) sólo lactosa.

6. En el promotor del operón *lac* de *E. coli*, la región -10 tiene la secuencia 5′-TATGTT-3′. Una mutación, de nombre UV5, cambia esta secuencia a 5′-TATAAT-3′ (véase la figura 21.6). La transcripción del promotor *lac* UV5 ya no depende del complejo CRP-cAMP. ¿Por qué?

7. Cuando se incuba β-[^{32}P]-ATP en un extracto de células eucarióticas capaz de transcripción y procesamiento del ARN, ¿dónde aparece la marca en el ARNm?

8. A diferencia de la ADN polimerasa, la ARN polimerasa no tiene actividad correctora. Explique por qué la carencia de esta actividad no es perjudicial para la célula.

9. Con frecuencia, el ARNm maduro de células eucarióticas se purifica para separarlo de otros componentes en la célula, usando columnas que contienen oligo (dT) celulosa. Esas columnas contienen segmentos cortos de residuos de desoxirribosa timidilasa de una hebra, oligo(dT), unidos a una matriz de celulosa. Explique la lógica para usar esas columnas en la purificación del ARNm maduro en una mezcla de componentes.

10. La rifampicina es un compuesto semisintético preparado de la rifamicina B, antibiótico aislado de *Streptomyces mediterranei*. La rifampicina es un medicamento aprobado antimicobacteriano, componente normal de regímenes de combinación para el tratamiento de la tuberculosis y las infecciones de estafilococos que resisten la penicilina. Los estudios recientes parecen indicar que se está volviendo más común la tuberculosis resistente a la rifampicina. Por ejemplo, 2% de muestras de un estudio en Botswana tuvo resistencia a la medicina. La tabla siguiente muestra algunos resultados con *E. coli* silvestre y *E. coli* con un solo cambio de aminoácido en la subunidad β de la ARN polimerasa (Asp a Tyr en la posición de aminoácido 516) y su crecimiento como respuesta a medios que contenían rifampicina. (Severinov, K., Soushko, M., Goldfarb, A. y Nikiforow, V. (1993). Rifampicin region revisited. *J. Biol. Chem*. 268:14820-14825).

E. coli	**Rifampicina**[a] (μg/mL)
Tipo silvestre	<5
Asp516Tir en subunidad β	>50

[a] Concentración de rifampicina en el punto de supresión de crecimiento de *E. coli.*

a) ¿Cómo interpreta usted estos datos?
b) ¿Qué papel tiene la subunidad β en la ARN polimerasa?
c) Describa un mecanismo para bacterias resistentes a rifampicina.

11. Un segmento de ADN en la parte media de un gen de *E. coli* tiene la secuencia que se ve enseguida. Escriba las secuencias de ARNm que se pueden producir al transcribir este segmento en las dos direcciones.

CCGGCTAAGATCTGACTAGC

12. ¿Se aplica la definición de gen, de la página 647, a los genes de ARNr y ARNt cuyo transcrito primario se ve en la figura 21.26?

13. En general, si se conoce la secuencia genómica de ADN en un gen, con confianza se puede predecir la secuencia de nucleótidos en el ARN codificado por ese gen. Esta afirmación ¿también es cierta para ARNt en procariotas? ¿Qué hay acerca de ARNt en eucariotas?

14. Suponga que se ensambla un espliceosoma en el primer intrón de un gen para la triosa fosfato isomerasa de maíz (figura 21.29) casi tan pronto como se transcribe el intrón (es decir, después de que unos 500 nucleótidos de ARN se han sintetizado). ¿Cuánto tiempo debe ser estable el espliceosoma si la reacción de empalme no puede efectuarse sino hasta que termine la transcripción? Suponga que la velocidad de transcripción por la ARN polimerasa II en el maíz es de 30 nucleótidos por segundo.

15. El complejo la CRP-cAMP reprime la transcripción del gen *crp*. Indique la localización del sitio de unión de la CRP-cAMP en relación con el promotor del gen *crp*.

16. ¿Por qué a veces las mutaciones son perjudiciales dentro de un intrón de un gen codificador de proteína?

17. Una eliminación en uno de los intrones del gen para la triosa fosfato isomerasa mueve el sitio de ramificación a un nuevo lugar, a 7 nucleósidos de distancia de la secuencia aceptora de empalme 3′. Esta eliminación ¿tendrá algún efecto sobre el empalme del gen?

Lecturas seleccionadas

Generalidades

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D. (2002). *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. (New York: Garland).

Lewin, B. (2000). *Genes VII* (New York: Oxford University Press).

ARN polimerasas y transcripción

Bushnell, D. A. y Kornberg, R. D. (2003). Complete, 12-subunit RNA polymerase II and 4.1-A resolution: Implications for the initiation of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci (U.S.A.)* 100:6969-6973.

Kornberg, R. D. (1999). Eukaryotic transcriptional control. *Trends Cell Biol.* 9:M46-M49.

Lisser, S. y Margalit, H. (1993). Compilation of *E. coli* mRNA promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 21:1507-1516.

Murakami, K. S., Masuda, S., Campbell, E. A., Muzzin, O. y Darst, S. A. (2002). Structural basis of transcription initiation: an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex. *Science* 296:1285-1290.

Richardson, J. P. (1993). Transcription termination. *Crit. Rev. Biochem*. 28:1-30.

Regulación de la transcripción

Becker, P. B. y Horz, W. (2002). ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* 71:247-273.

Bushman, F. D. (1992). Activators, deactivators and deactivated activators. *Curr. Biol.* 2:673-675.

Harrison, S. C. y Aggarwal, A. K. (1990). DNA recognition by proteins with the helix-turn-helix motif. *Annu. Rev. Biochem.* 59:933-969.

Kolb, A., Busby, S., Buc, H., Garges, S. y Adhya, S. (1993). Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu. Rev. Biochem.* 62:749-795.

Myers, L. C. y Kornberg, R. D. (2000). Mediator of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 69:729-749.

Wolfe, A. P. y Guschin, D. (2000). Review: chromatin structural features and targets that regulate transcription. *J. Struct. Biol.* 129:102-122.

Workman, J. L. y Kingston, R. E. (1998). Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 67:545-579.

Procesamiento de ARN

Apirion, D. y Miczak, A. (1993). RNA processing in prokaryotic cells. *BioEssays* 15:113-120.

Collins, C. A. y Guthrie, C. (2000). The question remains: is the spliceosome a ribozyme? *Nature Struct. Biol.* 7:850-854.

James, B. D., Olsen, G. J., Liu, J. y Pace, N. R. (1988). The secondary structure of ribonuclease P RNA, the catalytic element of a ribonucleoprotein enzyme. *Cell* 52:19-26.

Jurica, M. S. y Moore, M. J. (2003). Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Molecular Cell* 12:5-14.

McKeown, M. (1993). The role of small nuclear RNAs in RNA splicing. *Curr. Biol.* 5:448-454.

Proudfoot, N. (2000). Connecting transcription to messenger RNA processing. *Trends Biochem. Sci.* 25:290-293.

Nilsen, T. W. (2003). The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell? *BioEssays* 25:1147-1149.

Shatkin, A. J. y Manley, J. L. (2000). The ends of the affair: capping and polyadenylation. *Nature Struct. Biol.* 7:838-842.

Wahle, E. (1992). The end of the message: 3′-end processing leading to polyadenylated messenger RNA. *BioEssays* 14:113-118.

22

capítulo veintidós

Síntesis de proteínas

Ahora ya se puede examinar la etapa final del flujo de información biológica: la traducción del ARNm y la polimerización de aminoácidos para formar proteínas. Las funciones esenciales de la bioquímica de síntesis de proteínas fueron aclaradas en la década de 1955 a 1965. Era claro que había un código genético que se debía usar para traducir una secuencia de nucleótidos en una secuencia de aminoácidos. En 1955, Francis Crick propuso que el primer paso en este proceso era la fijación de un aminoácido a un ARN adaptador pequeño. Poco después se identificaron los adaptadores, que hoy se llaman ARN de transferencia. Se descubrieron los ribosomas y los demás componentes esenciales de la maquinaria de traducción, fraccionando células y reconstituyendo *in vitro* la síntesis de proteínas. Investigadores de varios laboratorios demostraron que el ARN mensajero es uno de los intermedios clave en el flujo de información del ADN a la proteína. Para 1961, el ingrediente más importante que faltaba era la naturaleza del código genético.

Este capítulo comenzará con una descripción del código genético y la estructura del ARNt. A continuación se examinará la forma en que participan ARNm, ARNt, ribosomas y proteínas accesorias en la síntesis de proteínas. También se presentarán algunos ejemplos sobre la regulación de la traducción, y el procesamiento después de la traducción.

22.1 El código genético

George Gamow fue quien propuso primero las unidades estructurales básicas del código genético. Dedujo que como el "alfabeto" del ADN sólo tiene cuatro "letras" (A, T, C y G), y ya que estas cuatro letras codifican 20 aminoácidos, el código genético debería contener "palabras" o **codones** con una longitud uniforme de tres letras. Las palabras de dos letras, formadas por cualquier combinación de las cuatro letras, producen un vocabulario con sólo 16 palabras (4^2), que no basta para los 20 aminoácidos. En contraste, las palabras de cuatro letras producen un vocabulario de 256 palabras (4^4), mucho mayor

Arriba: Ribosoma de *Escherichia coli.* El ribosoma es un complejo de ARN y proteína, y es el sitio donde la información genética se traduce en una proteína.

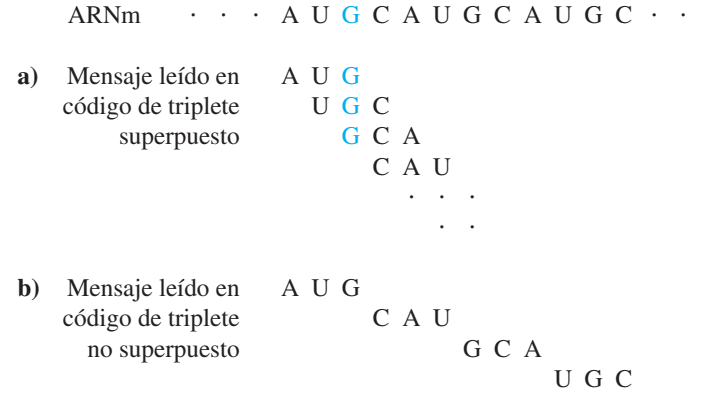


Figura 22.1 ▶
Mensaje leído en códigos de tres letras: **a)** superpuestas y **b)** no superpuestas. En un código superpuesto, cada letra es parte de tres palabras distintas de tres letras (como se indica para la letra G en gris); en un código no superpuesto, cada letra es parte de sólo una palabra de tres letras.

que lo necesario. Las palabras de tres letras permiten un vocabulario posible de 64 palabras (4^3), más que suficiente, pero no excesivo, para especificar cada uno de los 20 aminoácidos.

Lo "extraordinario" del código genético comenzó con una observación casual por Marshall Nirenberg y J. Heinrich Matthaei. Descubrieron que el poliuridilato (poli U) podía dirigir la síntesis de polifenilalanina *in vitro*. Así, al demostrar que UUU codifica la fenilalanina, descubrieron el primer codón.

Entre 1962 y 1965, varios investigadores, principalmente Nirenberg y H. Gobind Khorana, descifraron el resto del código. En total se necesitaron 10 años de trabajo intenso para aprender cómo el ARNm codifica a las proteínas. El desarrollo de métodos para secuenciar genes y proteínas ha permitido comparaciones directas de las secuencias primarias de proteínas con secuencias de nucleótidos de sus genes correspondientes. Cada vez que se caracteriza una nueva proteína y su gen, se confirma el código genético.

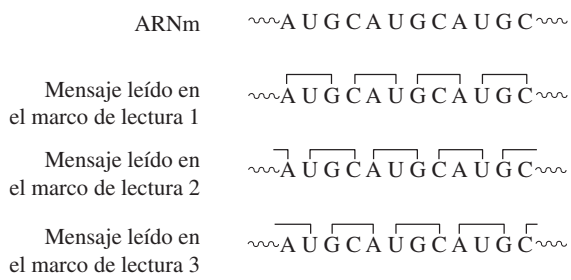
El ARN de transferencia (ARNt) juega un papel importante en la interpretación del código genético y la traducción de una secuencia de nucleótidos en una secuencia de aminoácidos. Los ARNt son los adaptadores entre el ARNm y las proteínas. Una región de una molécula de ARNt está unida en forma covalente a un aminoácido específico, en tanto que otra región de la misma molécula del ARNt interactúa en forma directa con un codón del ARNm por apareamiento de bases complementarias. Esta unión sucesiva de los aminoácidos especificados por una plantilla de ARNm es lo que permite la síntesis precisa de proteínas.

En principio, un código genético formado por palabras de tres letras puede ser superpuesto o no superpuesto (figura 22.1). Si se traslapan los codones, cada letra es parte de más de una palabra, y al mutar una sola letra se cambian varias palabras al mismo tiempo. Por ejemplo, en la secuencia de la figura 22.1a, cada letra es parte de tres palabras diferentes en un código superpuesto. Una de las ventajas de un código no superpuesto (figura 22.1b) es que cada letra sólo es parte de una palabra y en consecuencia al mutar un sólo nucleótido sólo se afecta un codón. Todos los organismos vivos usan código genético no superpuesto.

Incluso con un código no superpuesto, una secuencia puede traducirse en muchas formas diferentes, dependiendo de dónde comienza la traducción (después se verá que en el caso típico la traducción no comienza con el primer nucleótido en un ARNm). Cada punto potencial de inicio de la traducción define una secuencia única de palabras de tres letras, o **marco de lectura**, en el ARNm. La traducción correcta del "mensaje" transcrito o escrito en el código genético depende de establecer el marco de lectura correcto para la traducción (figura 22.2).

El código genético estándar se ve en la figura 22.3. Con pocas y pequeñas excepciones, todos los organismos vivos usan este código genético, lo que parece indicar que todas las especies modernas descienden de un ancestro común que también usó este código. Es probable que esta especie ancestral viviera hace miles de millones de años, haciendo que el código genético sea una de las reliquias más antiguas de la primera vida.

Por convención, todas las secuencias de nucleótidos se escribe en dirección $5' \rightarrow 3'$. Así, UAC especifica para tirosina y CAU es específica para histidina. El término *codón*



◀Figura 22.2
Un ARNm contiene tres marcos de lectura distintos. La misma serie de letras leída en tres marcos distintos de lectura se traducirá en tres "mensajes" diferentes de secuencias de proteína. Entonces, la traducción del mensaje correcto requiere seleccionar el marco de lectura correcto.

se suele referir a tripletes de nucleótidos en el ARNm, pero también se puede aplicar a tripletes de nucleótidos en la secuencia de ADN de un gen. Por ejemplo, un codón de ADN para tirosina es TAC.

Los codones siempre se traducen de 5′ → 3′, comenzando cerca del extremo 5′ del mensaje (es decir, el extremo que se sintetiza primero) y siguiendo hacia el extremo de la región codificadora, que suele estar cerca del extremo 3′ del ARNm. El marco de lectura correcto se especifica por signos especiales de puntuación, que marcan el inicio y el final.

El código genético estándar tiene varias propiedades notables:

1. El código genético no es impreciso. En determinado organismo u organelo, cada codón corresponde a uno y sólo un aminoácido.
2. Hay varios codones para la mayor parte de los aminoácidos. Por ejemplo, hay seis codones para serina, cuatro para glicina y dos para lisina. Debido a la existencia de varios codones para la mayor parte de los aminoácidos, se dice que el código genético es degenerado. Los diferentes codones que especifican el mismo aminoácido se llaman codones sinónimos. La degeneración del código genético minimiza los efectos de las mutaciones, porque al cambiar un sólo nucleótido con frecuencia se obtiene un codón que sigue especificando el mismo aminoácido. En el código genético estándar, los únicos aminoácidos con codones sencillos son metionina y triptófano.
3. Los dos primeros nucleótidos de un codón bastan, con frecuencia, para especificar determinado aminoácido. Por ejemplo, los cuatro codones para glicina (GGU, GGC, GGA y GGG) comienzan con GG.
4. Los codones con secuencias parecidas especifican aminoácidos químicamente similares. Por ejemplo, los codones para treonina difieren de cuatro de los codones para serina sólo en un nucleótido en la posición 5′, y los codones para aspartato

Primera posición (extremo 5′)	Segunda posición U	C	A	G	Tercera posición (extremo 3′)
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	PARO	PARO	A
	Leu	Ser	PARO	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

◀Figura 22.3
Código genético estándar. Está formado por 64 codones tripletes. La columna de la izquierda indica el nucleótido que se encuentra en la primera posición (la 5′) del codón; el renglón superior indica el nucleótido que está en la segunda posición (enmedio) del codón, y la tercera columna indica el nucleótido que se encuentra en la tercera posición (la 3′) del codón. El codón AUG especifica metionina (Met) y también se usa para iniciar la síntesis de proteína. PARO indica un codón de terminación.

y glutamato comienzan con GA y sólo difieren en la posición 3′. Además, los codones con pirimidinas en la segunda posición suelen codificar aminoácidos hidrofóbicos. En consecuencia, las mutaciones que alteran la posición 5′ o la 3′ de esos codones dan como resultado casi siempre la incorporación de un aminoácido químicamente similar en la proteína.

5. Sólo 61 de los 64 codones especifican aminoácidos. Los tres codones restantes (UAA, UGA y UAG) son codones de terminación, o codones de paro. Normalmente, las moléculas de ARNt en la célula no reconocen los codones de terminación. En su lugar, son reconocidos por proteínas específicas que hacen que los péptidos recién sintetizados se desprendan de la maquinaria de traducción. El codón para metionina, AUG, también especifica el sitio de iniciación para la síntesis de proteína, y con frecuencia se llama codón de inicio.

22.2 ARN de transferencia

Las moléculas de ARN de transferencia son los intérpretes del código genético. Son el eslabón más importante entre la secuencia de nucleótidos en el ARNm y la secuencia de aminoácidos en un polipéptido. Para que el ARNt cumpla con este papel, toda célula debe contener cuando menos 20 especies distintas de ARNt (una para cada aminoácido) y cada ARNt debe reconocer al menos un codón.

A. La estructura tridimensional del ARNt

Se han determinado las secuencias de nucleótidos de distintas moléculas de ARNt en muchos organismos. Las secuencias de casi todas esas moléculas son compatibles con la estructura secundaria que muestra la figura 22.4. Esta estructura en trébol contiene

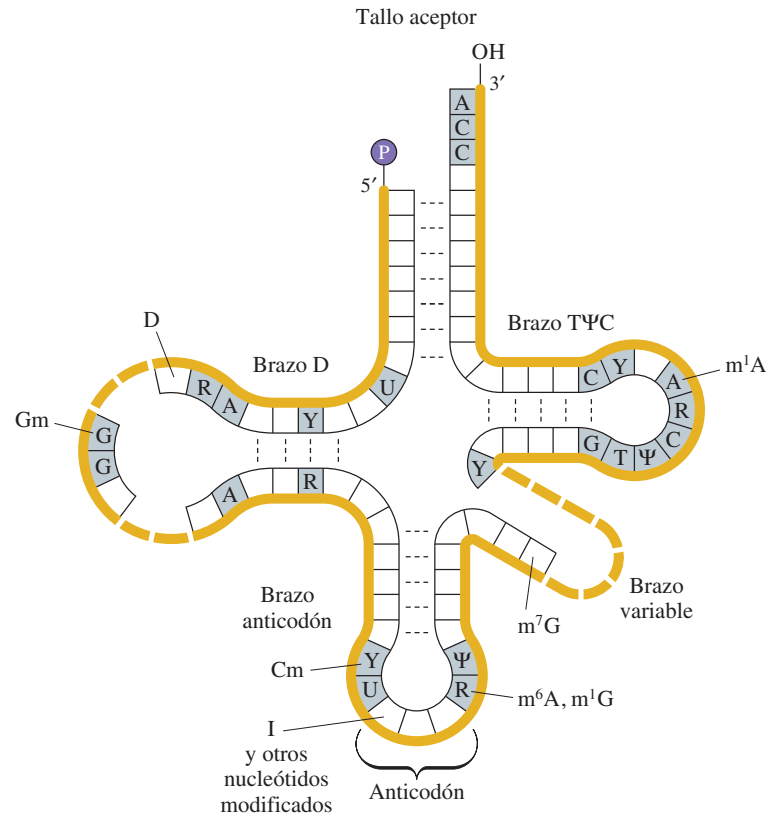


Figura 22.4 ▶
Estructura secundaria del ARNt en forma de trébol. El apareamiento de bases según Watson-Crick se indica por líneas interrumpidas entre residuos de nucleótido. La molécula se divide en un tallo aceptor y cuatro brazos. El tallo aceptor es el sitio de fijación del aminoácidos, y el brazo de anticodón es la región de la molécula de ARNt que interactúa con los codones en el ARNm. El nombre de los brazos D y TψC se debe a nucleótidos modificados que se conservan dentro de los brazos. La cantidad de residuos de nucleótido en cada brazo es más o menos constante, excepto en el brazo variable. Se indican las bases conservadas (gris) y la posición de nucleótidos comunes modificados. Otras abreviaturas de nucleótidos estándar: R, nucleótido de purina; Y, nucleótido de pirimidina; m^1A, 1-metiladenilato; m^6A, N^6-metiladenilato; Cm, 2′-*O*-metilcitidilato; D, dihidrouridilato; Gm, 2′-*O*-metilguanilato; m^1G, 1-metilguanilato; m^7G, 7-metilguanilato; I, inosinato; ψ, seudouridilato; T, ribonucleótido de timina.

varios brazos formados por una vuelta, o una vuelta con tallo unido con puentes de hidrógeno. La región de dos hebras en cada brazo forma una hélice corta, apilada y derecha, parecida a la del ADN de doble hebra.

El extremo 5′ y la región cercana al extremo 3′ de la molécula de ARNt tienen bases apareadas y forman el *tallo aceptor*, o tallo de aminoácidos. El aminoácido se une en forma covalente al ARNt en el extremo 3′ de este tallo. El grupo carboxilo del aminoácido se une al grupo 2′- o al 3′-OH de la ribosa de adenilato en el extremo 3′. (Recuérdese, de la sección 21.8A, que las moléculas maduras de ARNt se producen procesando un transcrito primario más grande, y que los nucleótidos en el extremo 3′ de una molécula madura de ARNt son CCA invariablemente). Todas las moléculas de ARNt tienen un nucleótido fosforilado en el extremo 5′.

El brazo de una hebra opuesto al tallo aceptor se llama bucle anticodón. Contiene al **anticodón**, la secuencia de tres bases que se une a un codón complementario en el ARNm. El brazo de la molécula de ARNt que contiene al anticodón se llama *brazo de anticodón*. Los nombres de dos de los brazos de la molécula de ARNt se deben a los nucleótidos modificados que están en ellos. (Véase la figura 21.25, con las estructuras de esos nucleótidos). Uno de los brazos se llama brazo TψC y contiene ribotimidilato (T) y seudouridilato (ψ) seguidos por citidilato (C). Los residuos de dihidrouridilato (D) dan su nombre al *brazo D*. Las moléculas de ARNt tienen también un *brazo variable* entre el brazo de anticodón y el *brazo TψC*. La longitud del brazo variable es de 3 a 21 nucleótidos. Con pocas y raras excepciones, las moléculas de ARNt tienen una longitud de 73 a 95 nucleótidos.

El diagrama en trébol del ARNt es una representación bidimensional de una molécula tridimensional. En tres dimensiones, la molécula de ARNt está doblada en forma de L (figuras 22.5 y 22.6). El tallo aceptor está en un extremo de la molécula en forma de L, y el anticodón está en una vuelta en el extremo opuesto. La estructura que resulta es compacta y muy estable, en parte debido a los puentes de hidrógeno entre los nucleótidos en los brazos D, TψC y variable. Este apareamiento de bases es distinto al apareamien-

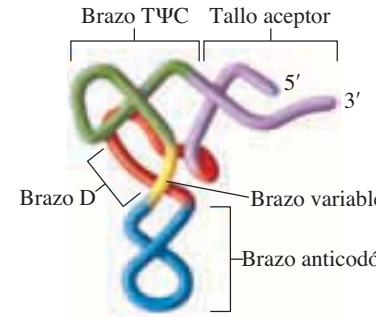
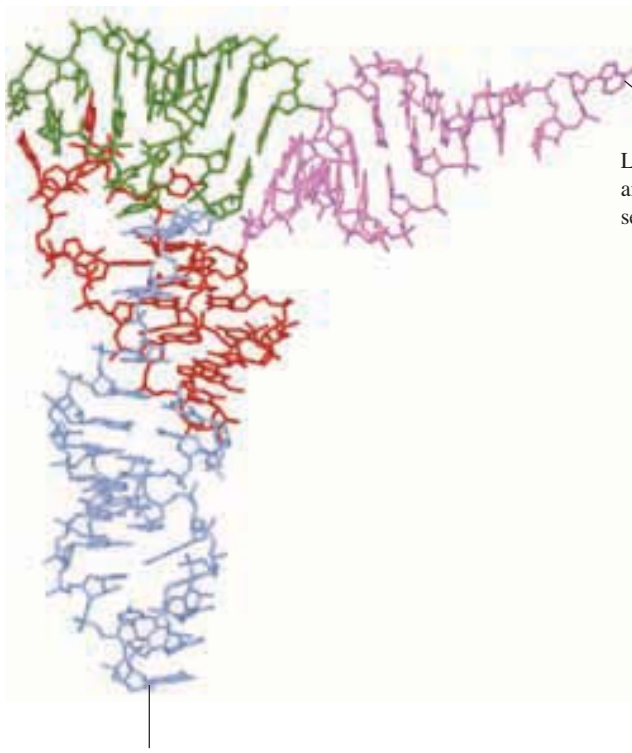


Figura 22.5 ▲
Estructura terciaria del ARNt. La molécula en forma de trébol de la figura 22.4 en realidad se pliega en esta forma tridimensional. La estructura terciaria del ARNt se debe al apareamiento de bases entre el brazo TψC y el brazo D, y dos interacciones de apilamiento que: a) alinean el brazo TψC con el brazo aceptor, y b) alinean el brazo D con el brazo anticodón. Para tener mayor claridad, sólo se muestra aquí el esqueleto de ribosa-fosfato.



◀Figura 22.6
Estructura de ARNt^{Fen} de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. El modelo de palillos muestra los pares de bases y la posición del brazo D (rojo) en relación con el brazo TψC (verde). Nótese que hay dos hélices de ARN de doble hebra formando ángulos rectos entre sí, en una estructura en forma de L. [NDB TRNA10]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

TABLA 22.1 Apareamiento esperado de bases entre la posición 5′ (tambaleo) del anticodón y la posición 3′ del codón

Nucleótido en la posición 5′ (tambaleo) del anticodón	Nucleótido en la posición 3′ del codón
C	G
A	U
U	A o G
G	U o C
I[a]	U,A, o C

[a] I = Inosinato.

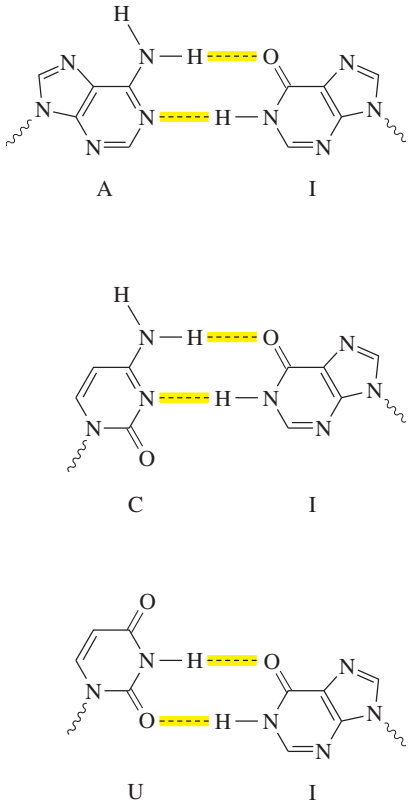


Figura 22.7 ▲
Pares de bases de inosinato. Con frecuencia se encuentra el inosinato (I) en la posición 5′ (de tambaleo) de un anticodón de ARNt. El inosinato puede formar puentes de hidrógeno con A, C o U. Esta versatilidad de formación de puentes de hidrógeno permite que un ARNt que tenga un solo anticodón reconozca más de un codón sinónimo.

to normal de bases, de Watson y Crick. La mayor parte de los nucleótidos en el ARNt son parte de dos hélices perpendiculares y apiladas; las interacciones de apilamiento entre las bases son aditivas y aportan una gran contribución a la estabilidad del ARNt, así como lo hacen en el ADN de doble hebra.

B. Apareamiento de bases de anticodones en ARNt con codones en ARNm

Las moléculas de ARNt y ARNm interactúan por apareamiento de bases entre anticodones y codones. En consecuencia, el anticodón de una molécula de ARNt determina dónde el aminoácido unido a su tallo aceptor se agrega a una cadena de polipéptido. Por ejemplo, la molécula de ARNt de la figura 22.6 tiene el anticodón GAA, que se une al codón UUC de la fenilalanina. Durante la síntesis de proteína, la fenilalanina se une en forma covalente al tallo aceptor de este ARNt. En consecuencia, la molécula se representa como $ARNt^{Fen}$.

Mucho del apareamiento de bases entre el codón y el anticodón obedece a las reglas de Watson-Crick de apareamiento de bases: A se aparea con U, G con C y las hebras en la región de bases apareadas son antiparalelas. Sin embargo, algunas excepciones a estas reglas condujeron a que Francis Crick propusiera que se requiere apareamiento de bases complementarias según Watson-Crick sólo para dos de los tres pares de bases formados. El codón debe formar pares de bases de Watson-Crick con las bases en 3′ e intermedia del anticodón, pero se permiten otros tipos de pares de bases en la posición 5′ del anticodón. Este apareamiento alternado sugiere que la posición 5′ tiene conformación flexible. Crick apodó "de tambaleo" a esa flexibilidad, y a veces a la posición 5′ del anticodón se le llama posición de tambaleo.

La tabla 22.1 resume los pares de bases permitidos entre la posición de tambaleo de un anticodón y la posición 3′ de un codón del ARNm. Por ejemplo, cuando G está en la posición de tambaleo, se puede aparear con C o con U (¡!). La base en la posición de tambaleo de muchos anticodones se modifica en forma covalente y permite más flexibilidad en el reconocimiento de un codón. Por ejemplo, en varias moléculas de ARNt, G en la posición 5′ de anticodón se desamina en el C-2 para formar inosinato (I), que puede formar puente de hidrógeno con A, C o U (figura 22.7). La presencia de I en la posición 5′ del anticodón explica por qué el $ARNt^{Ala}$ con el anticodón IGC se puede unir a tres codones diferentes que especifican alanina: GCU, GCC y GCA (figura 22.8).

El tambaleo permite que algunas moléculas de ARNt reconozcan más de un codón, pero con frecuencia se requieren varias moléculas diferentes de ARNt para reconocer todos los codones sinónimos. Moléculas diferentes de ARNt que se pueden fijar al mismo aminoácido se llaman **moléculas de ARNt isoaceptores**. El término *isoaceptor* se aplica a moléculas de ARNt con distintos anticodones que unen al mismo aminoácido, y también a moléculas de ARNt con el mismo anticodón pero con distintas secuencias primarias. Los ARNt isoaceptores se identifican con números romanos, o por los codones que reconocen (como $ARNt^{Ala}_{I}$, $ARNt^{Ala}_{II}$, o $ARNt^{Ala}_{GCG}$).

Los datos de secuencia del genoma indican que los genomas bacterianos codifican de 30 a 60 ARNt diferentes, y que los genomas eucarióticos tienen genes hasta para 80 moléculas de ARNt diferentes. Muchos de los genes eucarióticos de ARNt están presentes en varias copias, en especial los que codifican ARNt abundantes que se usan con más frecuencia para la síntesis de proteínas.

22.3 Aminoacil-ARNt sintetasas

Como en la síntesis del ADN y el ARN, la síntesis de las proteínas se puede dividir en las etapas de iniciación, alargamiento y terminación de la cadena. Sin embargo, en la descripción de la traducción se incluye un paso antes de la iniciación de la polimerización, que es la aminoacilación del ARNt. La activación de los aminoácidos se considera parte del proceso total de traducción, por ser un aspecto importante del flujo de información biológica del ácido nucleico a la proteína.

En la aminoacilación, un aminoácido determinado se une en forma covalente al extremo 3′ de cada molécula de ARNt. El producto de esta reacción se llama **aminoacil-ARNt**. Debido a que el aminoacil-ARNt es una molécula rica en energía, se dice que el aminoácido está "activado" para la transferencia siguiente a una cadena de polipéptido en crecimiento. Una molécula determinada de aminoacil-ARNt se identifica con el nombre del ARNt y el aminoácido unido; por ejemplo, el $ARNt^{Ala}$ aminoacilado se llama alanil-$ARNt^{Ala}$. Las diversas enzimas que catalizan la aminoacilación se llaman aminoacil-ARNt sintetasas (como alanil-ARNt sintetasa).

La mayor parte de las especies tienen al menos 20 aminoacil-ARNt sintetasas diferentes en cada célula, porque hay 20 aminoácidos. Unas pocas especies tienen dos aminoacil-ARNt sintetasas para el mismo aminoácido. Algunas bacterias no tienen glutaminil o asparaginil-ARNt sintetasas. En esas especies, la glutaminil y la asparaginil-ARNt se sintetizan modificando residuos de glutamato y aspartato después de que se han unido en forma covalente al $ARNt^{Gln}$ y al $ARNt^{Asn}$ por glutamil y aspartil-ARNt sintetasas. (Los residuos de glutamato y aspartato que estén unidos a sus ARNt adecuados no se modifican).

Aunque cada sintetasa es específica para determinado aminoácido, puede reconocer muchas moléculas de ARNt isoaceptor. Por ejemplo, hay seis codones para serina y varias moléculas diferentes de $ARNt^{Ser}$. Todas esas moléculas diferentes de $ARNt^{Ser}$ son reconocidas por una sola seril-ARNt sintetasa. La exactitud de la síntesis de proteína depende de la capacidad de las aminoacil-ARNt sintetasas para catalizar la fijación del aminoácido adecuado con el ARNt correcto.

A. Reacción de la aminoacil-ARNt sintetasa

La activación de un aminoácido por su aminoacil-ARNt sintetasa requiere ATP. La reacción total es

$$\text{Aminoácido} + \text{ARNt} + \text{ATP} \longrightarrow \text{Aminoacil-ARNt} + \text{AMP} + PP_i \qquad \textbf{(22.1)}$$

El aminoácido se fija a su molécula de ARNt mediante la formación de un enlace éster entre el grupo carboxilato del aminoácido y un grupo hidroxilo de la ribosa en el extremo 3′ de la molécula de ARNt. Como todos los ARNt terminan en —CCA, el sitio de fijación siempre es un residuo de adenilato.

La aminoacilación se efectúa en dos pasos discretos (figura 22.9, página siguiente). En el primero, el aminoácido se activa por la formación de un intermedio reactivo de aminoacil-adenilato. El compuesto intermedio permanece unido fuertemente, pero no en forma covalente, a la aminoacil-ARNt sintetasa. La hidrólisis siguiente del pirofosfato hace que la reacción sea esencialmente irreversible. El segundo paso de la formación del aminoacil-ARNt es la transferencia del grupo aminoacilo del compuesto intermedio al ARNt. El aminoácido se une al grupo hidroxilo en 2′ o en 3′ del residuo terminal de adenilato en el ARNt, dependiendo de la aminoacil-ARNt sintetasa específica que catalice la reacción. Si al principio el aminoácido está unido al grupo 2′-hidroxilo, éste se desplaza al grupo 3′-hidroxilo en un paso adicional. El aminoácido debe estar enlazado a la posición 3′ para servir como sustrato en la síntesis de proteína.

Bajo las condiciones celulares se favorece la formación del aminoacil-ARNt, y la concentración intracelular del ARNt libre es muy baja. La energía libre de hidrólisis de un aminoacil-ARNt es más o menos equivalente a la de un enlace fosfoanhídrido en el ATP. La energía almacenada en el aminoacil-ARNt se usa, en último término, en la formación de un enlace peptídico durante la síntesis de proteína. Nótese que se consumen dos equivalentes de ATP durante cada reacción de aminoacilación. Es parte del costo de la síntesis de proteínas.

B. Especificidad de las aminoacil-ARNt sintetasas

La fijación de un aminoácido específico a su molécula correspondiente de ARNt es un paso crítico en la traducción del mensaje genético. Si no se hace en forma exacta, podría incorporarse un aminoácido incorrecto en una proteína.

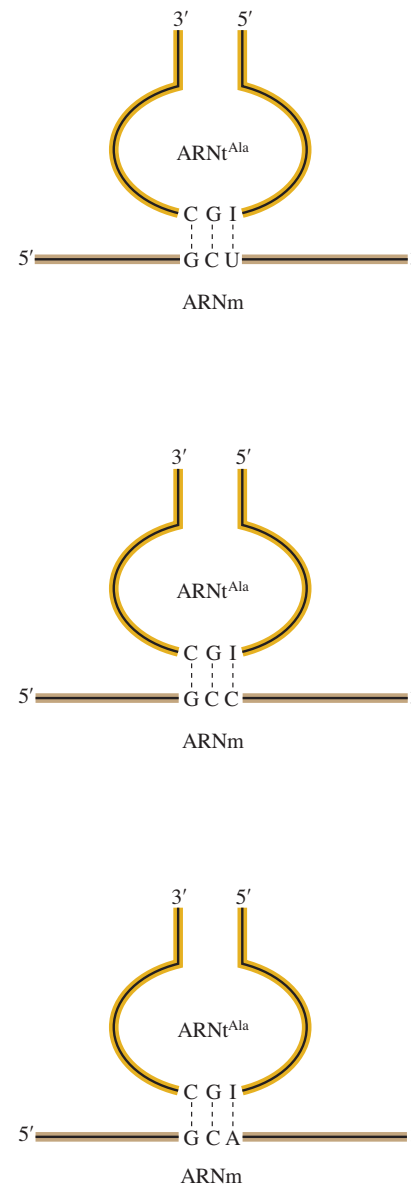


Figura 22.8 ▲
Apareamiento de bases en la posición de tambaleo. La molécula de $ARNt^{Ala}$ con el anticodón IGC puede unirse a cualquiera de tres codones que especifiquen alanina (GCU, GCC o GCA), porque I se puede aparear con U, C o A. Nótese que la hebra de ARN que contiene el codón, y la que contiene el anticodón, son antiparalelas.

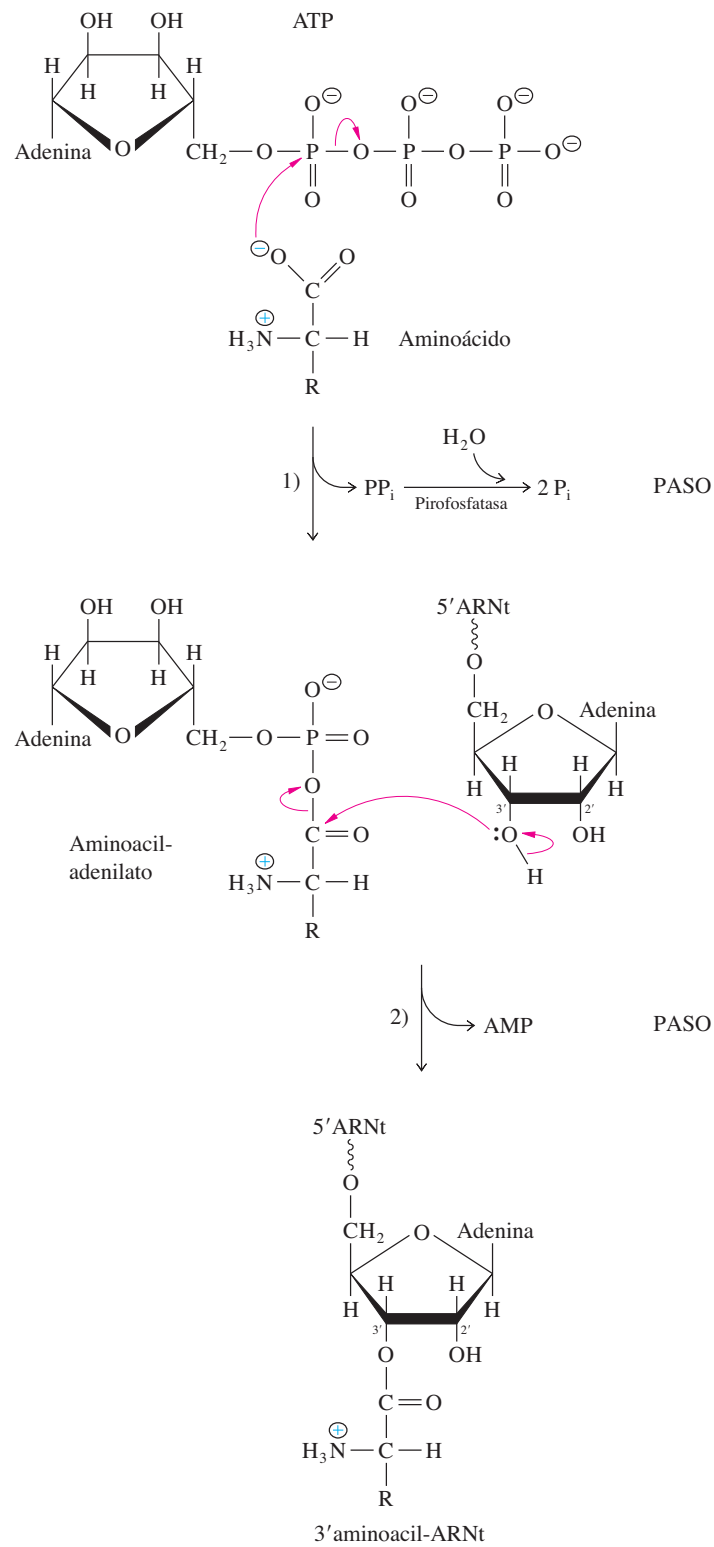
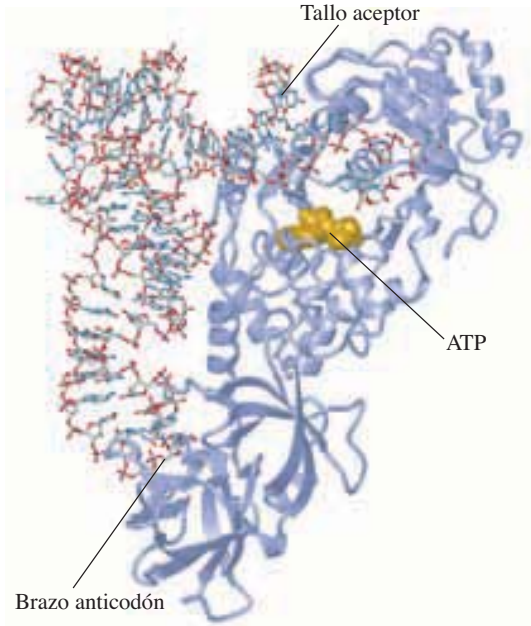


Figura 22.9 ▶
Síntesis de una molécula de aminoacil-ARNt catalizada por su aminoacil-tRNA sintetasa específica. En el primer paso, el grupo carboxilato (nucleofílico) del aminoácido ataca al átomo de fósforo α del ATP, desplazando pirofosfato y produciendo un aminoacil-adenilato intermedio. En el segundo paso, el ataque nucleofílico por el grupo 3′-hidroxilo del residuo terminal del ARNt causa el desplazamiento de AMP y la formación de una molécula de aminoacil-ARNt.

Cada aminoacil-ARNt sintetasa se une al ATP y selecciona el aminoácido adecuado basándose en su carga, tamaño e hidrofobicidad. Esta selección inicial elimina la mayor parte de los demás aminoácidos. Por ejemplo, la tirosil-ARNt sintetasa casi siempre se une a tirosina, pero rara vez a fenilalanina o a cualquier otro aminoácido. Entonces la



◀Figura 22.10
Estructura de $ARNt^{Gln}$ de *E. coli* unido a glutaminil-ARNt sintetasa. El extremo 3′ del ARNt está oculto en una hendidura en la superficie de la enzima. Una molécula de ATP también está unida a este sitio. La enzima interactúa con el tallo aceptor de ARNt y también con el anticodón. [PDB 1QRS]. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

sintetasa se une en forma selectiva a una molécula de ARNt. El ARNt adecuado se distingue por propiedades únicas de su estructura. En particular, la parte del tallo aceptor que está en la superficie interna de la molécula de ARNt en forma de L interviene en la unión del ARNt con la aminoacil-ARNt sintetasa (figura 22.10).

En algunos casos, la sintetasa reconoce al anticodón y también al tallo aceptor del ARNt. Un ejemplo de este tipo de interacción se muestra en la figura 22.10. Nótese que la glutaminil-ARNt sintetasa se pone en contacto con el tallo aceptor y la región de anticodón en el $ARNt^{Gln}$. La glutaminil-ARNt sintetasa no reconoce otros ARNt, asegurando así que la glutamina se una en forma específica al ARNt correcto. La estructura muestra también una molécula de ATP unida en el sitio activo cerca del extremo 3′ del ARNt.

La mitad de las 20 aminoacil-ARNt sintetasas diferentes se parecen a la glutaminil-ARNt sintetasa. Esas enzimas se unen al anticodón y aminoacilan al ARNt en el grupo 2′-hidroxilo. Un rearreglo posterior desplaza al grupo aminoacilo al grupo 3′-hidroxilo. Esas enzimas se llaman sintetasas clase I. Las aminoacil-ARNt sintetasas de la clase II a menudo son enzimas con subunidades, más complejas, y amionacilan al ARNt en el grupo 3′-hidroxilo. En todos los casos, el efecto neto de la interacción entre el ARNt y la sintetasa es colocar el extremo 3′ de la molécula de ARNt en el sitio activo de la enzima.

C. Actividad correctora de las aminoacil-ARNt sintetasas

Debido a su especificidad hacia determinado aminoácido, la frecuencia de errores en la mayor parte de las aminoacil-ARNt sintetasas es baja. Sin embargo, la isoleucina y la valina son aminoácidos químicamente semejantes, y ambos caben en el sitio activo de la isoleucil-ARNt sintetasa (figura 22.11, página siguiente). La isoleucil-ARNt sintetasa cataliza, en forma errónea, la formación del compuesto intermedio valil-adenilato más o menos en 1% de los casos. Con base en esta observación, cabría esperar que la valina se fijara a la isoleucil-ARNt y se incorporara en proteínas, en vez de isoleucina, más o menos en 1% de los casos. Sin embargo, la sustitución de valina por isoleucina en cadenas de polipéptido se presenta más o menos una vez por cada 10 000. Este valor menor de incorporación de valina parece indicar que la isoleucil-ARNt sintetasa discrimina también entre los dos aminoácidos después de la formación del aminoacil-adenilato. De hecho, la isoleucil-ARNt sintetasa efectúa la corrección en el paso siguiente de la

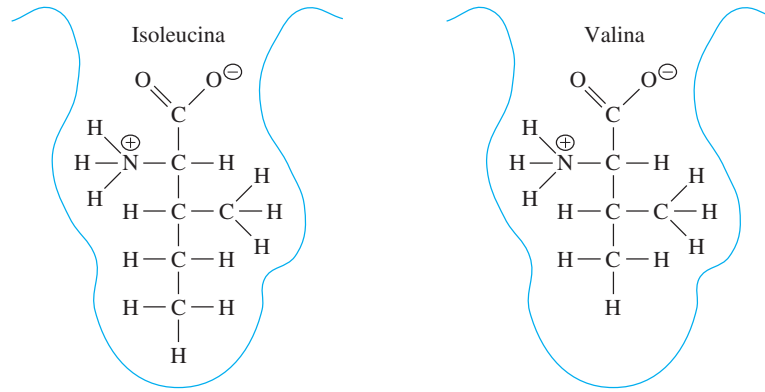


Figura 22.11 ▶
Modelo del sitio de unión con el sustrato en la isoleucil-ARNt sintetasa. A pesar del tamaño y cargas similares de isoleucina y valina, la isoleucil-ARNt sintetasa se une a la isoleucina unas 100 veces más fácilmente que a la valina. Un paso posterior de corrección ayuda también a evitar la formación de valil-ARNt^{Ile}.

reacción. Aunque la isoleucil-ARNt sintetasa puede catalizar en forma errónea la formación de valil-adenilato, en general cataliza la hidrólisis del valil-adenilato incorrecto para formar valina y AMP, o la hidrólisis del valil-ARNt^{Ile}.

No todas las aminoacil-ARNt sintetasas requieren actividad de corrección. Por ejemplo, las cadenas laterales en la fenilalanina y la tirosina difieren en un grupo hidroxilo, pero la tirosil-ARNt sintetasa puede diferenciar con eficacia entre esos sustratos. El sitio activo de la enzima, activa en forma incorrecta una fenilalanina por cada 100 000 tirosinas.

22.4 Ribosomas

En la síntesis de proteína se requieren cuatro componentes discretos que deben ensamblarse para formar un complejo de traducción elaborado: el ribosoma, que cataliza la formación de enlaces peptídicos; sus factores accesorios de proteína, que ayudan al ribosoma en cada paso del proceso; el ARNm, que lleva la información que especifica la

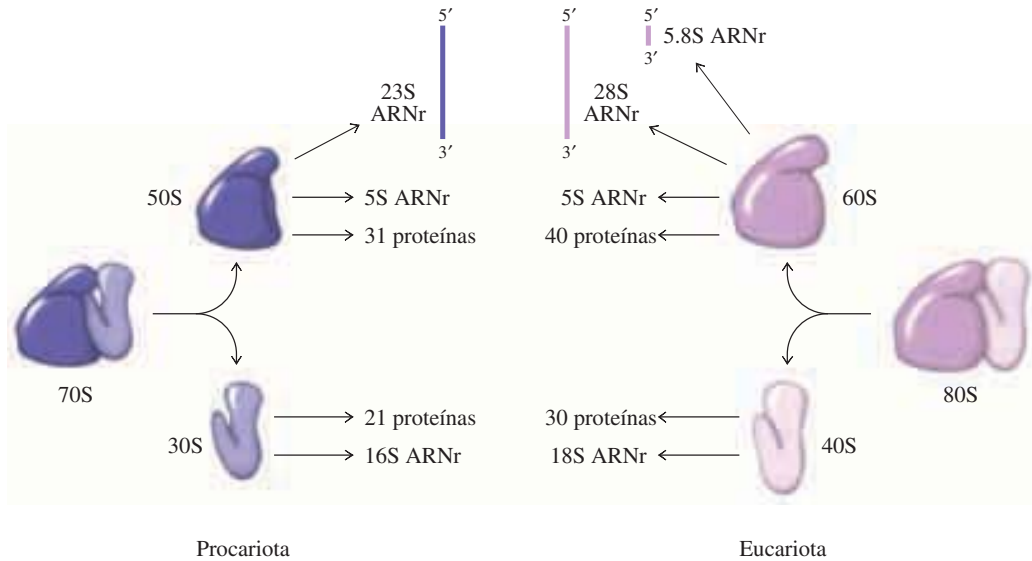


Figura 22.12 ▲
Comparación de los ribosomas procarióticos y eucarióticos. Ambos tipos de ribosoma consisten en dos subunidades, y cada una contiene ARN ribosómico y proteínas. La subunidad grande del ribosoma procariótico contiene dos moléculas de ARNr: 5S y 23S. La subunidad grande de casi todos los ribosomas eucarióticos contiene tres moléculas de ARNr: 5S, 5.8S y 28S. La secuencia del ARNr eucariótico 5.8S se parece a la secuencia del extremo 5′ del ARNr procariótico 23S.

secuencia de la proteína, y los aminoacil-ARNt que transportan a los aminoácidos activados. El inicio consiste en ensamblar el complejo de traducción en el primer codón del ARNm. Durante el alargamiento de la cadena de polipéptido, se mueven o traslocan, el ribosoma y los componentes asociados a lo largo de la plantilla de ARNm, en dirección $5' \rightarrow 3'$. El polipéptido es sintetizado desde su N-terminal hasta su C-terminal. Por último, cuando se completa la síntesis de la proteína, se desensambla el complejo de traducción en un paso aparte de terminación. Una función importante del desensamble es liberar las dos subunidades ribosómicas del ARNm, para que puedan participar en más rondas de traducción.

A. Los ribosomas están formados por ARN ribosómico y proteína

Todos los ribosomas contienen dos subunidades de tamaño desigual. En *E. coli*, la subunidad pequeña se llama subunidad 30S, y la subunidad grande se llama subunidad 50S. (Los términos 30S y 50S se referían originalmente a la velocidad de sedimentación de esas subunidades). La subunidad 30S es alargada y asimétrica, y sus dimensiones generales son de $5.5 \times 22 \times 22.5$ nm. Un cuello angosto separa la cabeza de la base, y una saliente se extiende desde la base y forma una hendidura donde parece descansar la molécula de ARNm. La subunidad ribosómica 50S es más ancha que la subunidad 30S y tiene varias salientes; sus dimensiones son más o menos $15 \times 20 \times 20$ nm. La subunidad 50S también contiene un túnel de unos 10 nm de longitud y 2.5 nm de diámetro. Este túnel va desde el sitio de formación del enlace peptídico y da cabida a la cadena creciente de polipéptido durante la síntesis de proteína. Las subunidades 30S y 50S se combinan para formar un ribosoma activo 70S.

En *E. coli*, el componente de ARN en la subunidad 30S es un ARNr 16S de 1 542 nucleótidos. Aunque su longitud exacta varía entre las especies, este ARNr 16S contiene extensas regiones de estructura secundaria que se conservan mucho en los ribosomas de todos los organismos vivos. Hay 21 proteínas ribosómicas en la subunidad 30S. La subunidad 50S del ribosoma de *E. coli* contiene dos moléculas de ARN ribosómico: un ARNr 5S de 120 nucleótidos y un ARNr 23S de 2 904 nucleótidos. Hay 31 proteínas diferentes asociadas a las moléculas de ARNr 5S y 23S en la subunidad 50S (figura 22.12).

Los ribosomas eucarióticos tienen forma similar a los bacterianos, pero los de algunos eucariotas, en forma notable de vertebrados y plantas de flor, son algo mayores y más complejos. Los ribosomas intactos de vertebrados se designan 80S, y están formados por subunidades 40S y 60S (figura 22.12). La subunidad 40S pequeña es análoga a la subunidad 30S del ribosoma procariótico; contiene unas 30 proteínas y una sola molécula de ARNr 18S. La subunidad grande 60S contiene unas 40 proteínas y tres moléculas de ARN ribosómico: ARNr 5S, ARNr 28S y ARNr 5.8S. El ARNr 5.8S tiene unos 160 nucleótidos de longitud, y su secuencia es parecida a la del extremo $5'$ del ARNr 23S procariótico. Esta semejanza implica que el ARNr 5.8S y el extremo $5'$ del ARNr 23S procariótico se derivan de un ancestro común, y que ha habido una fusión o división de ARNr genético durante su evolución.

Los genomas procarióticos y eucarióticos contienen copias múltiples de genes de ARN ribosómico. La combinación de una gran cantidad de copias y de fuertes promotores para esos genes permite a las células mantener un alto nivel en la síntesis de ribosoma. Los genes de ARN ribosómico de eucariotas, transcritos por ARN polimerasa I (sección 21.5A) se presentan como grupos de cientos de copias en tándem. En la mayoría de los eucariotas, esos genes están agrupados en el nucleolo, donde sucede el procesamiento de precursores del ARN ribosómico y el ensamble del ribosoma (sección 21.8B). Este procesamiento se acopla al ensamble del ribosoma, como se ve en la figura 22.13 para la subunidad 30S de *E. coli*. Muchas de las proteínas ribosómicas tocan al ARN y se unen en forma específica a regiones de estructura secundaria del ARNr 16S. Otras forman contactos de proteína a proteína, y se ensamblan dentro del complejo sólo cuando están presentes otras proteínas ribosómicas.

En la figura 22.14 se ve la estructura de la subunidad ribosómica 30S de la bacteria *Thermus thermophilus*. Nótese que la mayor parte de la masa del ribosoma se debe

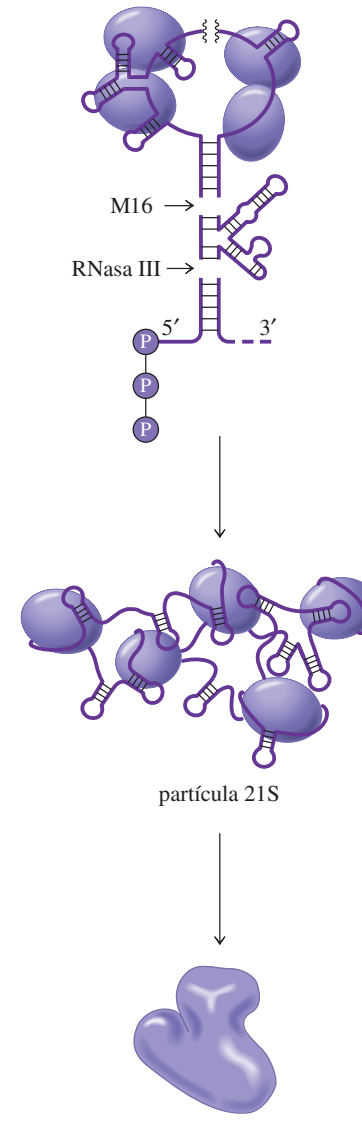


Figura 22.13 ▲
Ensamble de la subunidad ribosómica 30S y maduración del ARNr 16S en *E. coli*. El ensamble de la subunidad ribosómica 30S comienza cuando se unen seis o siete proteínas ribosómicas al ARNr precursor 16S al momento de que se está transcribiendo, y se forma así una partícula 21S. La partícula 21S sufre un cambio de conformación y la molécula de ARNr 16S se procesa hasta su longitud final. Durante este procesamiento, se unen las proteínas ribosómicas restantes de la subunidad 30S (recuérdese que M16 es una endonucleasa específica de sitio que interviene en el procesamiento de ARN, que se describió en el capítulo 21).

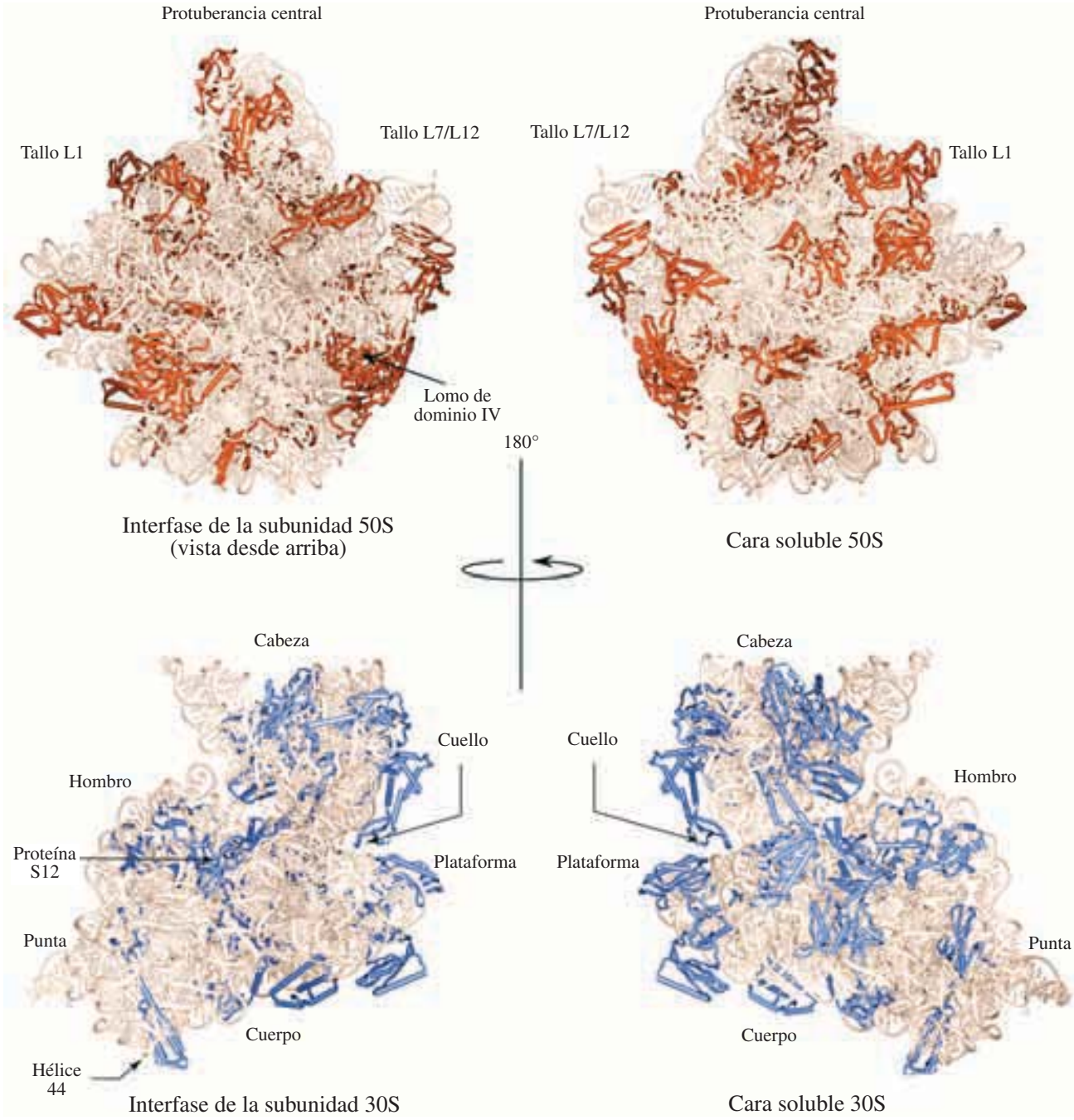


Figura 22.14 ▲
Estructuras tridimensionales de la subunidad 50S en *H. marismortui* (arriba) y de la subunidad 30S de *T. thermophilus* (abajo). En cada subunidad, el ARN se representa en color crema y las proteínas ribosómicas en anaranjado (50S) o en azul (30S). (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

al ARN ribosómico 16S, que forma una estructura compacta de múltiples regiones de ARN de doble hebra. Las proteínas ribosómicas se unen a la superficie del ARN o a las hendiduras y huecos entre regiones de la estructura secundaria del ARN.

El ensamblaje de la subunidad bacteriana 50S y las subunidades eucarióticas 40S y 60S también se acoplan al procesamiento de precursores de ARN ribosómicos. En la figura 22.14 también se muestra la estructura de la subunidad 50S del arqueon *Haloarcula marismortui.*

B. Los ribosomas contienen dos sitios de unión con aminoacil-ARNt

Los sustratos para la formación del enlace peptídico no son aminoácidos libres, sino moléculas de aminoacil-ARNt relativamente grandes. Un ribosoma debe alinear a dos moléculas adyacentes de aminoacil-ARNt de tal modo que sus anticodones interactúen con los codones correctos del ARNm. Los extremos aminoacilados de esos dos ARNt se ubican en el sitio de formación del enlace peptídico. El ribosoma también tiene que sujetar al ARNm y a la cadena creciente de polipéptido, y debe dar cabida al enlace de varios factores proteínicos durante la síntesis de proteína. La capacidad de efectuar esas tareas en forma simultánea explica, en parte, por qué el ribosoma es tan grande y complejo.

La orientación de las dos moléculas de ARNt durante la síntesis de proteínas se muestra en la figura 22.15. La cadena creciente de polipéptido se une en forma covalente al ARNt ubicado en el sitio peptidilo (sitio P), formando peptidil-ARNt. El segundo aminoacil-ARNt está unido al sitio aminoacilo (sitio A). Al sintetizarse la cadena de polipéptido, pasa por el túnel de la subunidad ribosómica grande, y emerge en la superficie externa del ribosoma.

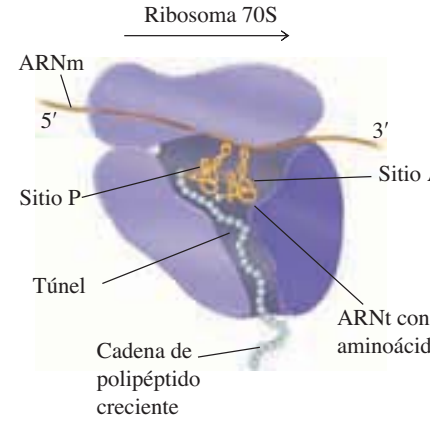


Figura 22.15 ▲
Sitios de unión del ARNt en ribosomas procarióticos. Durante la síntesis de proteína, el sitio P está ocupado por la molécula de ARNt unida a la cadena de polipéptido creciente , y el sitio A sostiene un aminoacil-ARNt. La cadena de polipéptido en crecimiento pasa por el túnel de la subunidad grande.

22.5 Iniciación de la traducción

El inicio de la síntesis de proteína consiste en ensamblar un complejo de traducción al principio de una secuencia de codificación de ARNm. Este complejo consiste de las dos subunidades ribosómicas, una plantilla de ARNm que se va a traducir, una molécula de ARNt de inicio y varias proteínas accesorias llamadas factores de iniciación. El paso crucial de inicio asegura que se seleccione el codón correcto de inicio (y en consecuencia el marco de lectura correcto) antes de que comience la traducción.

A. ARNt de inicio

Como se mencionó en la sección 22.1, el primer codón que se traduce suele ser AUG. Toda célula contiene al menos dos tipos de moléculas de metionil-ARNt^{Met} que pueden reconocer codones AUG. Un tipo se usa en forma exclusiva en codones de inicio, y se llama **ARNt de inicio.** El otro tipo sólo reconoce codones internos de metionina. Aunque estas dos moléculas de ARNt^{Met} tienen distintas secuencias primarias y diversas funciones, las dos están aminoaciladas por la misma metionil-ARNt sintetasa.

En las bacterias, al ARNt de inicio se le llama ARNt$_f^{Met}$. El ARNt de inicio con carga (metionil-ARNt$_f^{Met}$) es el sustrato para la formiltransferasa que cataliza la adición de un grupo formilo del 10-formiltetrahidrofolato al residuo de metionina, produciendo *N*-formilmetionil-ARNt$_f^{Met}$ (fMet-ARNt$_f^{Met}$), como se muestra en la figura 22.16. En eucariotas y arqueobacterias, el ARNt de inicio se llama ARNt$_i^{Met}$. La metionina que inicia la síntesis de proteínas en eucariotas no está formilada.

En las bacterias, la *N*-formilmetionina, o metionina en otros organismos, es el primer aminoácido que se incorpora dentro de las proteínas. Después de que se está efectuando la síntesis de proteína, la metionina N-terminal puede desformilarse o bien eliminarse de la cadena de polipéptido.

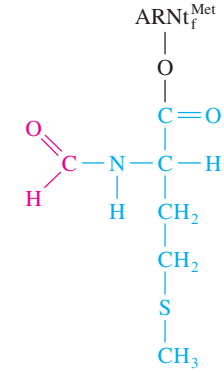


Figura 22.16 ▲
Estructura química de fMet-ARNt$_f^{Met}$. Se añade un grupo formilo (gris oscuro) a la mitad del metionilo (gris claro) de la metionil-ARNt$_f^{Met}$ en una reacción catalizada por formiltransferasa.

B. Complejos de iniciación: sólo se ensamblan en codones de inicio

Hay tres marcos de lectura posibles en una molécula de ARNm, pero sólo uno de ellos es correcto. Es crítico establecer el marco de lectura correcto durante el inicio de la traducción para que la decodificación de información de ARNm a la proteína sea exacta. Si se desplaza el marco de lectura aunque sea sólo un nucleótido se alteraría la secuencia de todo el polipéptido y se produciría una proteína no funcional. Por consiguiente, la maquinaria de traducción debe localizar con exactitud al codón de inicio que sirve como sitio de arranque en la síntesis de la proteína.

El ribosoma necesita diferenciar entre el AUG único correcto y todos los demás AUG incorrectos. Estos otros AUG especifican residuos internos de metionina en el marco de lectura correcto, o codones irrelevantes de metionina en los otros dos marcos de lectura incorrectos. Es importante apreciar que el codón de inicio no sólo es el primero de los tres nucleótidos del ARNm. Los codones de inicio pueden ubicarse muchos nucleótidos adelante del final del extremo 5′ del mensaje.

En los procariotas, la selección de un sitio de inicio depende de una interacción entre la subunidad pequeña del ribosoma y la plantilla del ARNm. La subunidad 30S se une a la plantilla del ARNm en una región rica en purinas, justo antes del codón correcto de inicio. Esta región se llama secuencia de Shine-Dalgarno y es complementaria a un tramo rico en pirimidinas en el extremo 3′ de la molécula de ARNr 16S. Durante la formación del complejo de inicio, estos nucleótidos complementarios se aparean para formar una estructura de ARN de doble hebra, que une el ARNm al ribosoma. El resultado de esta interacción es posicionar el codón de inicio en el sitio P del ribosoma (figura 22.17). Como no hay secuencias de Shine-Dalgarno inmediatamente antes de los codones internos de metionina, el complejo de inicio sólo se ensambla en los codones de inicio.

C. Los factores de iniciación ayudan a formar el complejo de inicio

En la formación del complejo de inicio se requieren varios **factores de iniciación**, además de los ribosomas, el ARNt iniciador y el ARNm. Los procariotas contienen tres factores de iniciación, llamados IF-1, IF-2 e IF-3. Hay al menos ocho factores de iniciación

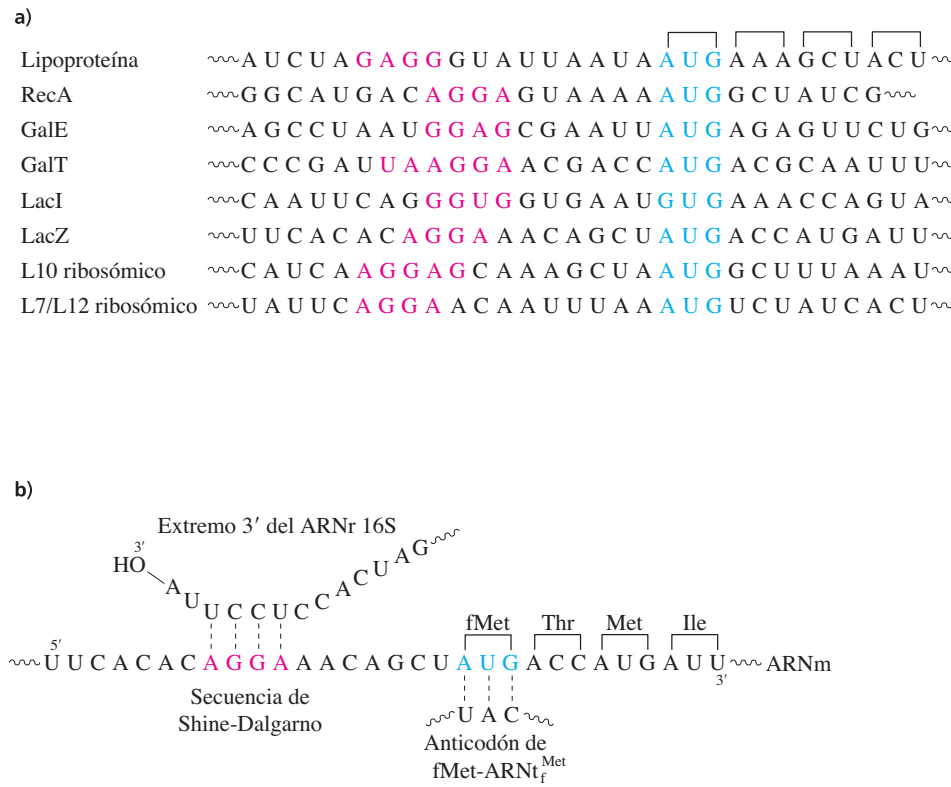


Figura 22.17 ▲
Secuencias de Shine-Dalgarno en ARNm de *E. coli*. **a)** Sitios de unión con ribosoma en el extremo 5′ del ARNm para varias proteínas de *E. coli*. Las secuencias de Shine-Dalgarno (gris oscuro) están antes de los codones de iniciación (gris claro). **b)** Apareamiento de bases complementarias entre el extremo 3′ de ARNr 16S y la región cercana al extremo 5′ de un ARNm. La unión del extremo 3′ delARNr 16S con la secuencia de Shine-Dalgarno ayuda a establecer el marco de lectura correcto para la traducción, ubicando el codón de iniciación en el sitio P del ribosoma.

eucarióticos (eIF, *eukaryotic initiation factor*). En los procariotas y en los eucariotas, los factores de iniciación catalizan el ensamble del complejo de la síntesis de proteína en el codón de inicio.

Una de las funciones del IF-3 es mantener las subunidades ribosómicas en su estado disociado, uniéndose a la subunidad pequeña. Las subunidades ribosómicas se unen por separado al complejo de inicio, y la asociación del IF-3 con la subunidad 30S evita que las subunidades 30S y 50S formen prematuramente el complejo 70S. El IF-3 también ayuda a posicionar al fMet-ARNt$_f^{Met}$ y al codón de inicio en el sitio P del ribosoma. El IF-2 selecciona al ARNt iniciador del conjunto de moléculas aminoaciladas de ARNt en la célula. Se une a GTP y forma un complejo IF-2-GTP que reconoce en forma específica al ARNt de inicio y rechaza las demás moléculas de aminoacil-ARNt. El tercer factor de iniciación, IF-1, se une a la subunidad 30S y facilita las acciones de IF-2 e IF-3.

Una vez formado el complejo 30S en el codón de inicio, la subunidad ribosómica 50S se une a la subunidad 30S. A continuación, el GTP unido al IF-2 se hidroliza y se libera P_i. Cuando se hidroliza el GTP, los factores de iniciación se disocian del complejo. El IF-2-GTP se regenera cuando el GDP unido se cambia por GTP. Los pasos de la formación del complejo de inicio 70S se resumen en la figura 22.18, en la siguiente página.

El papel de los factores de iniciación procarióticos consiste en asegurar que el ARNt de inicio aminoacilado (fMet-ARNt$_i^{Met}$) se halle correctamente posicionado hacia el codón de inicio. Los factores de iniciación también median la formación de un complejo de inicio al reconstituir un ribosoma 70S de tal manera que el codón de inicio se posicione en el sitio P.

D. Inicio de la traducción en eucariotas

Uno de los factores de iniciación más importantes en los eucariotas es el eIF-4 (*eukaryotic initiation factor 4,* factor 4 de iniciación eucariótico). Este factor también se llama proteína de unión con cubierta (CBP, *cap binding protein*), porque se une en forma específica a la cubierta de 7-metilguanilato en el extremo 5′ del ARNm eucariótico. La unión del eIF-4 a la estructura de la cubierta lleva a la formación de un complejo de preinicio, formado por la subunidad ribosómica 40S, ARNt de inicio aminoacilado y otros factores diferentes de iniciación. Entonces, el complejo de preinicio busca a lo largo del ARNm en la dirección 5′ → 3′ hasta que encuentra un codón de inicio. Cuando la búsqueda tiene éxito, la subunidad ribosómica pequeña se coloca de tal modo que el Met-ARNt$_i^{Met}$ interactúa con el codón de inicio en el sitio P. En el paso final se agrega la subunidad ribosómica 60S para completar el complejo de inicio 80S, y todos los factores de iniciación se disocian. La disociación del eIF-2, la contraparte eucariótica del IF-2 bacteriano, se acompaña por hidrólisis de GTP.

Los ARNm eucarióticos no tienen secuencias marcadas de Shine-Dalgarno que sirvan como sitios de unión con el ribosoma. En su lugar, el primer codón AUG en el mensaje suele servir como codón de inicio. Como el mecanismo normal de selección del codón de inicio por búsqueda a lo largo del ARNm a partir del extremo 5′ sólo permite un codón de inicio por ARNm, la mayoría de las moléculas de ARNm eucariótico sólo codifican un polipéptido. En contraste, los ARNm procarióticos contienen con frecuencia varias regiones de codificación. Cada región de codificación comienza con un codón de inicio que está asociado a su propia secuencia previa de Shine-Dalgarno. Las moléculas de ARNm que codifican varios polipéptidos se llaman **policistrónicas**.

22.6 Alargamiento de cadena: microciclo de tres pasos

Al final del paso de iniciación, el ARNm se coloca de tal modo que el siguiente codón pueda ser traducido durante la etapa de alargamiento en la síntesis de proteína. El ARNt de inicio ocupa el sitio P en el ribosoma, y el sitio A está listo para recibir un aminoacil-ARNt. Durante el alargamiento de la cadena, cada aminoácido adicional se agrega a la cadena naciente de polipéptido en un microciclo de tres pasos. Los pasos de este mi-

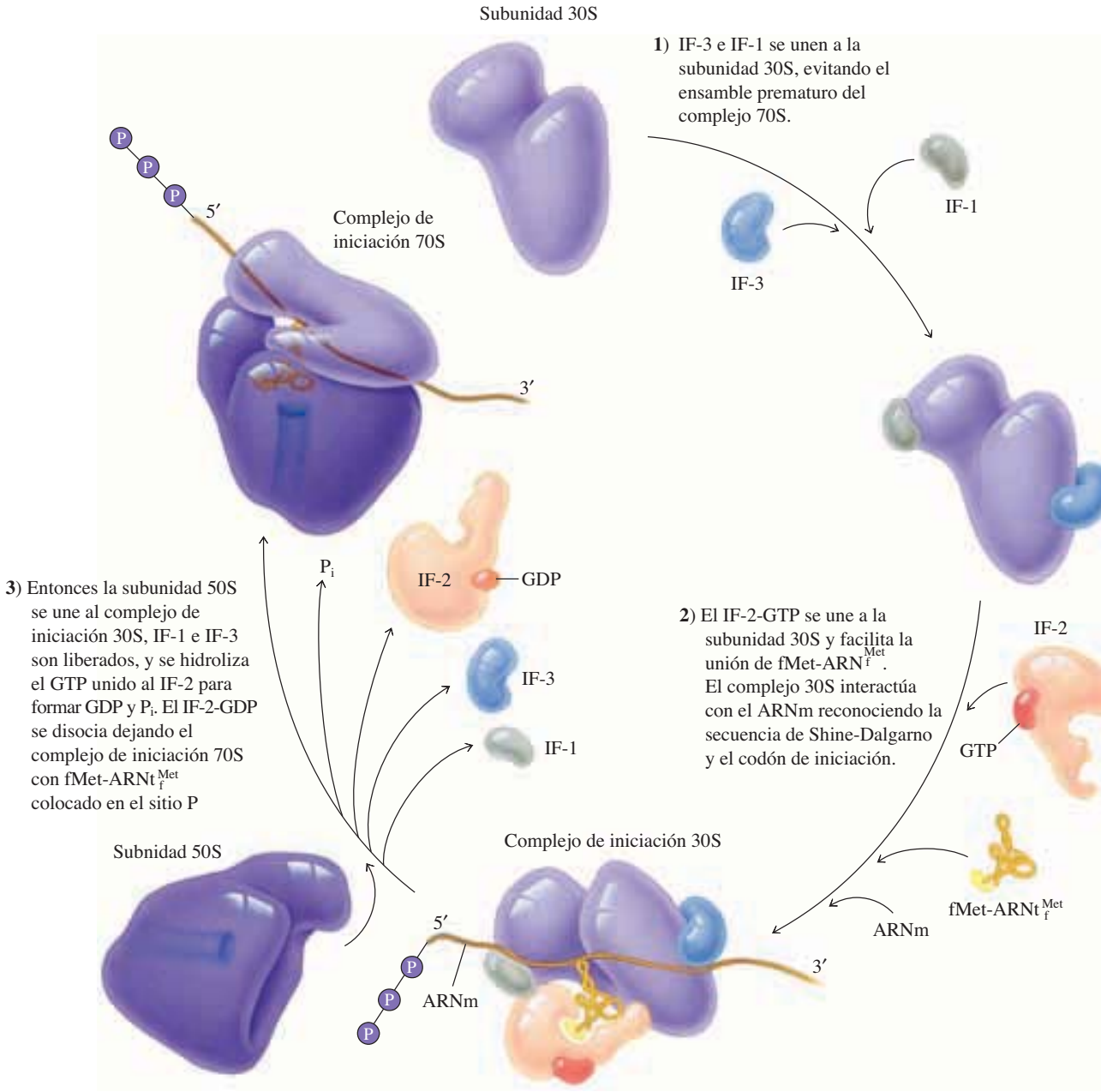
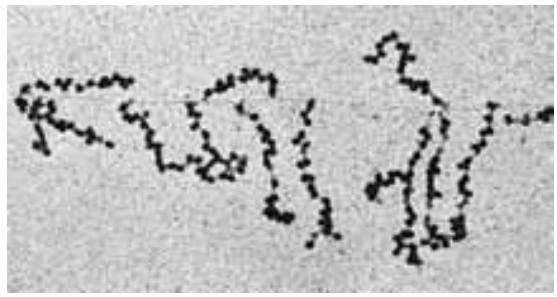


Figura 22.18 ▲
Formación del complejo de iniciación 70S procariótico.

crociclo son: 1) posicionamiento del aminoacil-ARNt correcto en el sitio A del ribosoma; 2) formación del enlace peptídico y 3) desplazamiento, o translocación del ARNm en un codón en relación con el ribosoma (los dos ARNt en los sitios P y A del ribosoma también se traslocan).

La maquinaria de traducción trabaja con relativa lentitud en comparación con los sistemas enzimáticos que catalizan la replicación del ADN. Las proteínas se sintetizan a velocidades que sólo son de 18 residuos de aminoácido por segundo, en tanto que los replisomas bacterianos sintetizan al ADN a una velocidad de 1 000 nucleótidos por se-



◀Figura 22.19
Transcripción y traducción acopladas de un gen de *E. coli*. El gen se está transcribiendo de izquierda a derecha. Los ribosomas se unen al extremo 5′ de las moléculas de ARNm tan pronto como se sintetizan. Los polisomas grandes de la derecha se separan del gen cuando termina la transcripción.

gundo. Esta diferencia de velocidades refleja, en parte, la diferencia entre polimerizar cuatro tipos de nucleótidos para obtener ácidos nucleicos, y polimerizar 20 tipos de aminoácidos para obtener proteínas. La prueba y rechazo de moléculas incorrectas de aminoacil-ARNt tarda y desacelera la síntesis de proteínas.

La tasa aproximada de transcripción en los procariotas es de 55 nucleótidos por segundo, que corresponde a unos 18 codones por segundo, o la misma velocidad con que se traduce el ARNm. En las bacterias, el inicio de la traducción sucede tan pronto como se sintetiza el extremo 5′ de un ARNm, y se acoplan traducción y transcripción (figura 22.19). Este estrecho acoplamiento no es posible en los eucariotas, porque transcripción y traducción se efectúan en compartimientos separados de la célula, el núcleo y el citoplasma, respectivamente. En el núcleo deben procesarse los precursores eucarióticos del ARNm (p. ej., colocación de la cubierta, poliadenilación, corte y empalme) antes de ser exportados al citoplasma para la traducción.

Una célula de *E. coli* contiene unos 20 000 ribosomas, y muchas células eucarióticas grandes tienen varios cientos de miles de ribosomas. Las moléculas grandes de ARNm se pueden traducir en forma simultánea mediante muchos complejos de síntesis de proteína, formando un polirribosoma o **polisoma** como el que se ve en la figura 22.19. La cantidad de ribosomas unidos a una molécula de ARNm depende de la longitud del ARNm y la eficiencia de inicio de la síntesis de proteína. A la eficiencia máxima, el espaciamiento entre cada complejo de traducción en el polisoma es de 100 nucleótidos, aproximadamente. En promedio, cada molécula de ARNm en una célula de *E. coli* se traduce 30 veces, y con ello amplifica 30 veces la información que contiene.

A. Los factores de alargamiento acoplan a un aminoacil-ARNt en el sitio A

Al inicio del primer microciclo de alargamiento de cadena, el sitio A está vacío y el sitio **P** está ocupado por el ARNt de inicio aminoacilado. El primer paso en el alargamiento de la cadena es la inserción del aminoacil-ARNt correcto en el sitio A del ribosoma. En las bacterias, este paso es catalizado por un factor de alargamiento llamado EF-Tu. Es una proteína monomérica que contiene un sitio de enlace para GTP. Cada célula de *E. coli* tiene unas 135 000 moléculas de EF-Tu, por lo que es una de las proteínas más abundantes en ella.

El EF-Tu-GTP se asocia a una molécula de aminoacil-ARNt para formar un complejo ternario que cabe en el sitio A de un ribosoma. Casi todas las moléculas de aminoacil-ARNt *in vivo* se encuentran en esos complejos ternarios (figura 22.20, página siguiente). La estructura del EF-Tu es parecida a la del IF-2 (que también se une a GTP) y otras proteínas G (sección 9.12A), lo que sugiere que todas evolucionaron a partir de una proteína ancestral común.

El complejo EF-Tu-GTP reconoce las propiedades comunes en la estructura terciaria de las moléculas del ARNt, y se une con fuerza a todas las moléculas de aminoacil-ARNt, excepto fMet-ARNt_f^{Met}. Esta última molécula se distingue entre todas las demás de aminoacil-ARNt por la estructura secundaria diferente de su tallo aceptor.

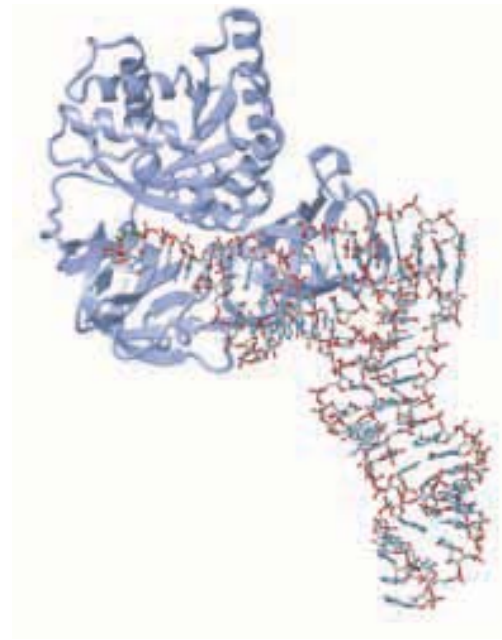


Figura 22.20 ▶
EF-Tu se une a los ARNt aminoacilados. El complejo EF-Tu-GTP se une al extremo aceptor del ARNt aminoacilado (en este caso, fenilalanil-ARNt^{Fen}). El residuo de fenilalanina se representa en verde. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

Un complejo ternario de EF-Tu-GTP-aminoacil-ARNt se puede difundir libremente al sitio A en el ribosoma. Cuando se forman pares correctos de bases entre el anticodón del aminoacil-ARNt y el codón de ARNm en el sitio A, el complejo se estabiliza.

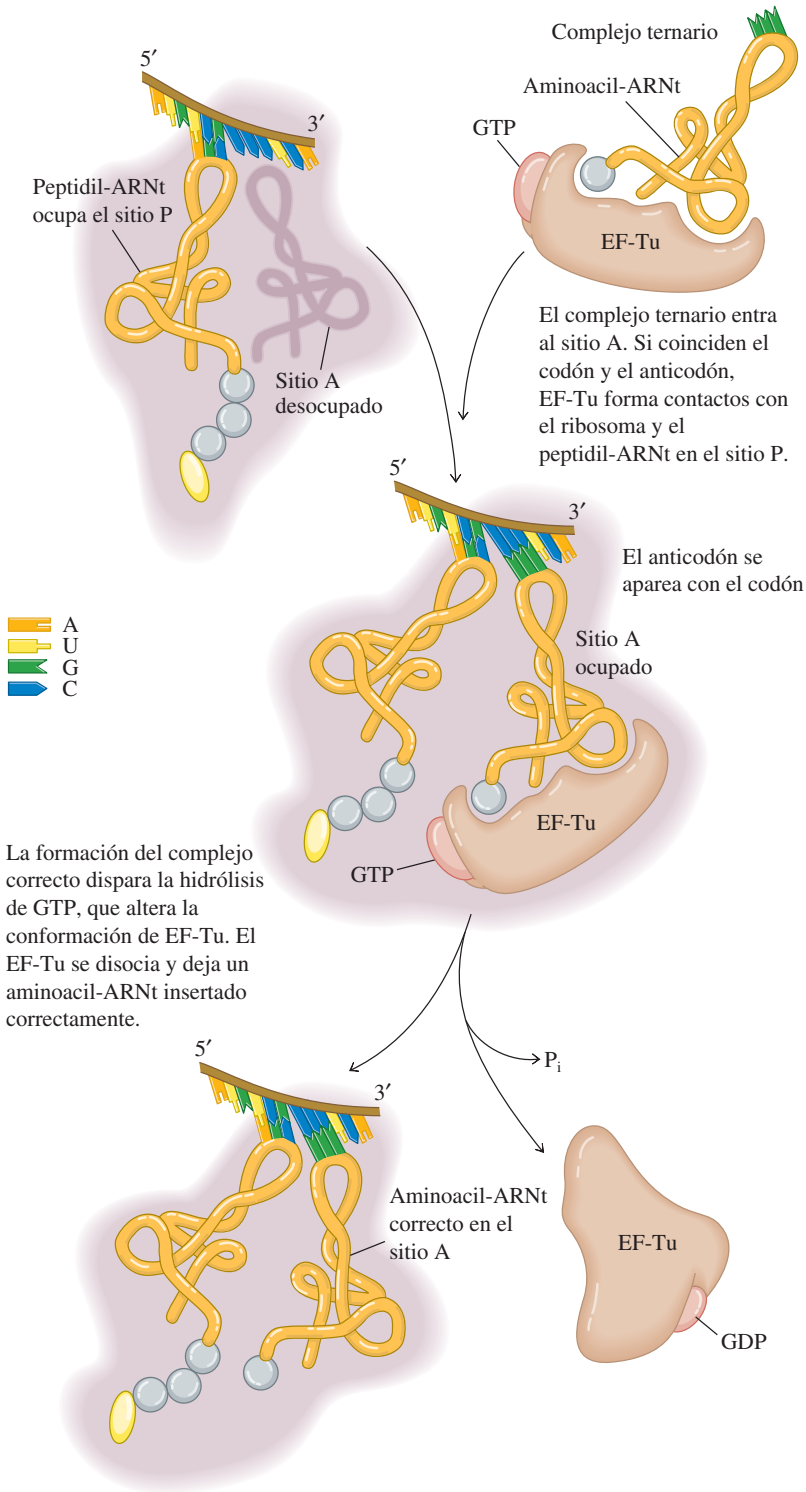
A continuación, el EF-Tu-GTP puede ponerse en contacto con sitios del ribosoma y también con el ARNt en el sitio P (figura 22.21). Estos contactos disparan la hidrólisis de GTP a GDP y P_1, causando un cambio de conformación en el EF-Tu-GDP, que suelta al aminoacil-ARNt enlazado. Entonces, el EF-Tu-GDP se disocia del complejo de alargamiento de cadena. El aminoacil-ARNt permanece en el sitio A, donde se coloca en posición para la formación del enlace peptídico.

El EF-TU-GDP no puede unirse a otra molécula de aminoacil-ARNt hasta que se disocie el GDP. Un factor adicional de alargamiento llamado EF-Ts cataliza el intercambio de GDP con GTP (figura 22.22, página 702). Nótese que se hidroliza una molécula de GTP por cada aminoacil-ARNt que se inserte bien en el sitio A.

B. La peptidil transferasa cataliza la formación del enlace peptídico

Al unirse un aminoacil-ARNt correcto al sitio A se alinea el grupo α-amino del aminoácido activado, que está junto al carbonilo de enlace éster, en el peptidil-ARNt en el sitio P vecino. El par solitario de electrones en el átomo de nitrógeno ejecuta un ataque nucleofílico sobre el carbono carbonílico, lo que da como resultado la formación de un enlace peptídico mediante una reacción de desplazamiento. Si bien es directo visualizar cómo el sitio activo del ribosoma alinea a esos sustratos, no se comprende bien cómo es que el ribosoma aumenta la velocidad de esta reacción. La cadena peptídica, que ahora tiene un aminoácido más a lo largo, se transfiere del ARNt en el sitio P, al ARNt en el sitio A (figura 22.23, página 703). La formación del enlace peptídico requiere la hidrólisis del enlace peptidil-ARNt rico en energía. Nótese que la cadena de polipéptido en crecimiento está unida en forma covalente al ARNt en el sitio A, formando un peptidil-ARNt.

La actividad enzimática que causa la formación del enlace peptídico se llama **peptidil transferasa**. Esta actividad está dentro de la subunidad ribosómica grande. Tanto la molécula de ARNt 23S como las proteínas ribosómicas 50S contribuyen a los sitios de unión con sustrato, pero la actividad catalítica está en el componente de ARN. Así, la peptidil transferasa es otro ejemplo de una reacción catalizada por ARN.



◀Figura 22.21
Inserción de un aminoacil-ARNt por EF-Tu durante la elongación de la cadena en *E. coli*. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

C. La traslocación mueve al ribosoma un codón

Después que se ha formado el enlace peptídico, el peptidil-ARNt recién creado está en parte en el sitio A y en parte en el sitio P (figura 22.24, página 704). El ARNt desaminoacilado se ha desplazado algo respecto del sitio P. Ahora ocupa una posición en el ribosoma, que se llama sitio de salida o **sitio E** (*E* = *exit*, salida). Antes de que se pueda

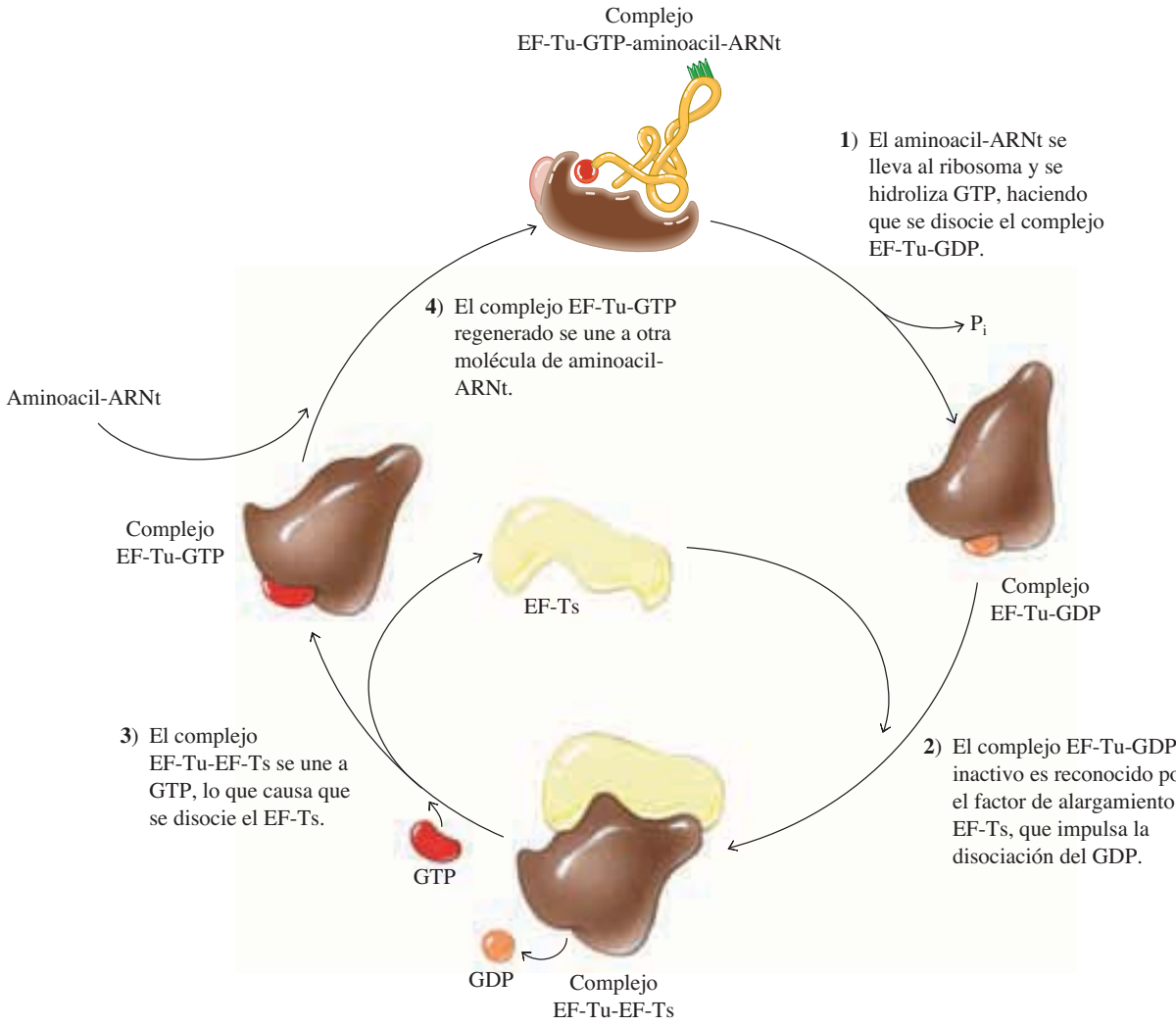
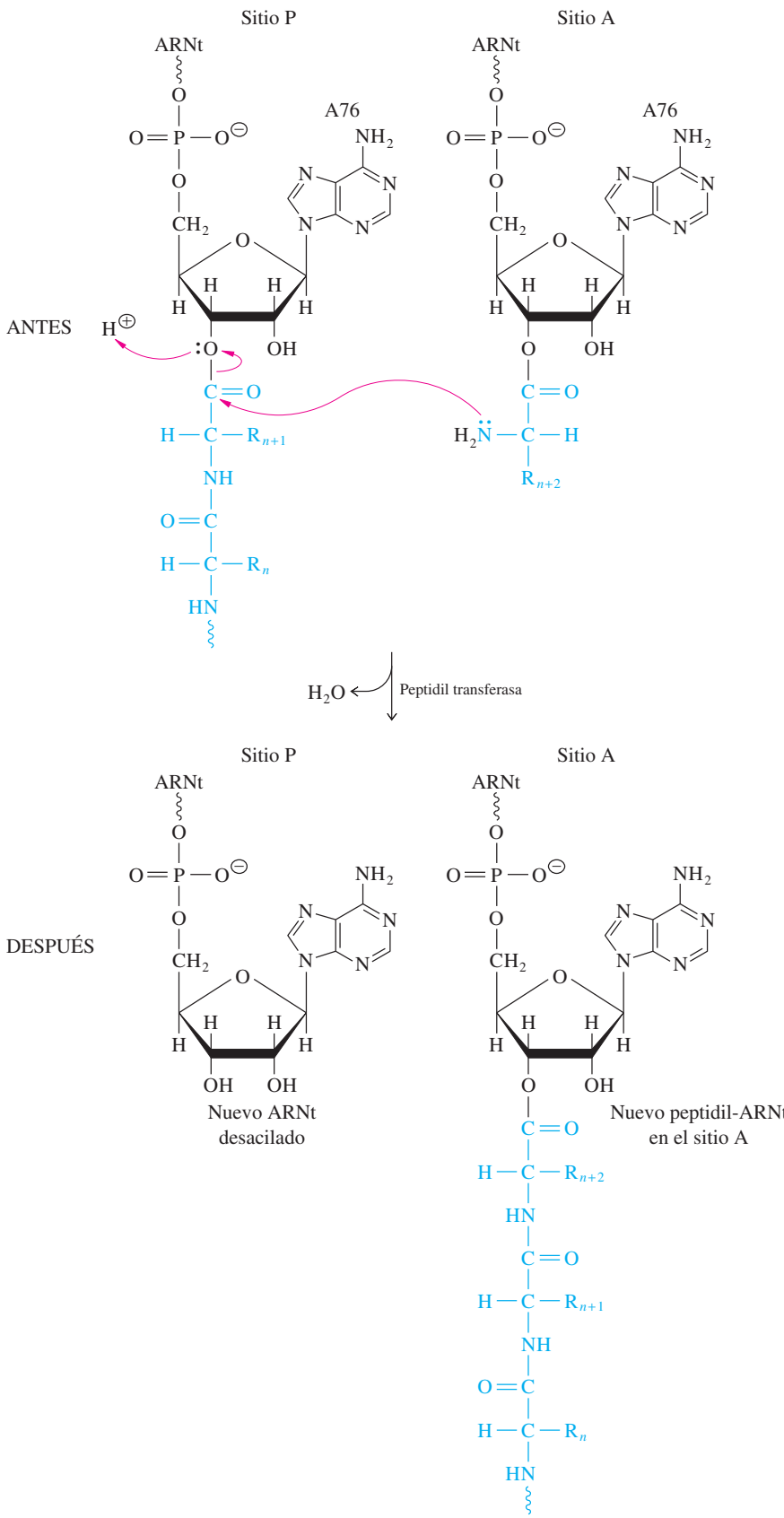


Figura 22.22 ▲
Ciclo de EF-Tu-GTP.

traducir el siguiente codón, debe separarse el ARNt desaminoacilado, y el peptidil-ARNt debe transferirse totalmente del sitio A al sitio P. Al mismo tiempo, el ARNm debe desplazarse un codón en relación con el ribosoma. Esta **traslocación** es el tercer paso del microciclo de alargamiento de la cadena.

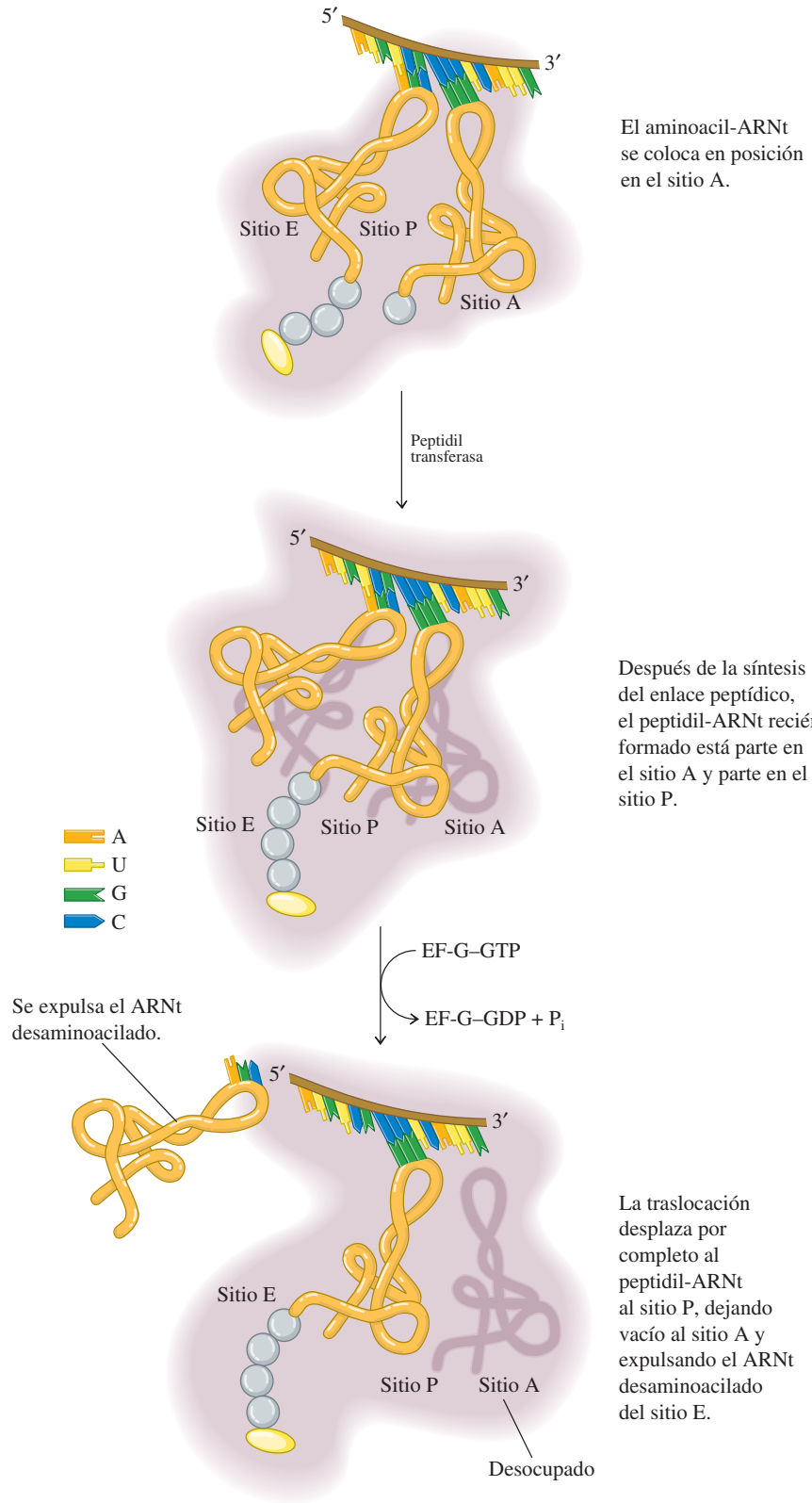
En los procariotas, el paso de traslocación requiere un tercer factor de alargamiento, el EF-G. Igual que otros factores de alargamiento, el EF-G es una proteína abundante; una célula de *E. coli* contiene unas 20 000 moléculas de EF-G, más o menos una por cada ribosoma. Lo mismo que el EF-Tu, el EF-G tiene un sitio de unión con GTP. El enlazamiento de EF-G-GTP con el ribosoma completa la traslocación del peptidil-ARNt del sitio A al sitio P, y separa al ARNt desaminoacilado del sitio E. El EF-G mismo se libera del ribosoma sólo cuando su GTP enlazado se hidroliza a GDP y P_i. La disociación del EF-G-GDP deja libre al ribosoma para iniciar otro microciclo de alargamiento de la cadena.

La cadena creciente de polipéptido se extiende desde el peptidil-ARNt en el sito P, pasa por un túnel en la subunidad 50S y sale a la superficie exterior del ribosoma (figura 22.15). Cada paso de traslocación impulsa la cadena por el túnel. El polipéptido recién sintetizado no se comienza a doblar en su forma final sino hasta que sale del túnel. Unas chaperonas, como la HSP70, ayudan a este doblamiento; las chaperonas están asociadas a la maquinaria de traducción (sección 4.10D).



◀Figura 22.23
Formación de un enlace peptídico. El carbono carbonílico del peptidil-ARNt sufre ataque nucleofílico por el átomo de nitrógeno del grupo amino. Esta reacción de transferencia de grupo aminoacilo causa el crecimiento de la cadena de péptido en un residuo, y la transferencia del péptido naciente al ARNt en el sitio A.

Figura 22.24 ▶
Traslocación durante la síntesis de proteína en procariotas. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).



El microciclo de alargamiento se repite por cada nuevo codón que se traduce en el ARNm, y resulta en la síntesis de una cadena de polipéptido que puede tener varios

cientos de residuos de longitud. Al final, el complejo de traducción llega al codón final, al extremo de la región codificada, donde termina la traducción.

Las reacciones de alargamiento en los eucariotas son muy parecidas a las que suceden en *E. coli*. Tres factores proteínicos accesorios participan en el alargamiento de la cadena en los eucariotas: EF-1α, EF-1β y EF-2. El EF-1α acopla al aminoacil-ARNt en el sitio A; por ello su actividad es paralela a la del EF-Tu de *E. coli*. El EF-1β funciona como el EF-Ts bacteriano, reciclando EF-1α. El EF-2 efectúa la traslocación en los eucariotas. El EF-Tu y el EF-1α son proteínas homólogas muy conservadas, como también EF-G y EF-2. Los ARN ribosómicos eucarióticos y procarióticos también son muy parecidos en secuencia y en estructura secundaria. Estas semejanzas indican que el ancestro común de procariotas y eucariotas sintetizaba proteínas en una forma parecida a la que se ve en los organismos modernos. Así, la síntesis de proteínas es una de las reacciones bioquímicas más antiguas y fundamentales.

22.7 Terminación de la traducción

E. coli tiene tres factores de liberación (RF-1, RF-2 y RF-3) (RF, *release factor)* que participan en la terminación de la síntesis de proteína. Después de la formación del enlace peptídico final, el peptidil-ARNt se trasloca desde el sitio A hasta el sitio P, como es lo usual. La traslocación posiciona uno de los tres codones de terminación (UGA, UAG o UAA) en el sito A. Esos codones de terminación no son reconocidos por molécula alguna de ARNt, por lo que la síntesis de proteína se detiene en el codón de terminación. Al final, uno de los factores de liberación se difunde al sitio A. El RF-1 reconoce UAA y UAG, y el RF-2 reconoce UAA y UGA. El RF-3 se une a GTP e intensifica los efectos del RF-1 y el RF-2.

Cuando los factores de liberación reconocen a un codón de terminación, causan la hidrólisis del peptidil-ARNt. Es probable que la liberación del polipéptido terminado se acompañe de la hidrólisis de GTP y la disociación de los factores de liberación del ribosoma. En este punto, las subunidades ribosómicas se separan del ARNm y los factores de iniciación se unen a la subunidad 30S, como preparación para la siguiente ronda de síntesis de proteína.

22.8 La síntesis de proteínas es costosa en energía

La síntesis de proteínas es muy costosa; usa una gran fracción de todos los equivalentes de ATP disponibles en una célula. ¿Dónde va toda esa energía?

Por cada aminoácido agregado a una cadena de polipéptido, se rompen cuatro enlaces fosfoanhídrido: el ATP se hidroliza a AMP + 2 P_i durante la activación del aminoácido, y se hidrolizan dos moléculas de GTP a 2 GDP + 2 P_i durante el alargamiento de la cadena. La hidrólisis del GTP se acopla a cambios de conformación en la maquinaria de traducción. En este sentido, el GTP y el GDP funcionan como moduladores alostéricos. Sin embargo, a diferencia de la mayor parte de cambios de conformación inducidos por moduladores alostéricos, los cambios de conformación que suceden durante la síntesis de proteínas están asociados a un considerable consumo de energía.

La hidrólisis de cuatro enlaces fosfoanhídrido representa un gran cambio de energía libre; mucho más que la que se requiere para formar un solo enlace peptídico. La mayor parte de la energía "extra" compensa la pérdida de entropía durante la síntesis de proteínas. La disminución de entropía se debe principalmente al ordenamiento específico de 20 clases distintas de aminoácido para formar una cadena de polipéptido. Además se pierde entropía cuando un aminoácido se une a un ARNt en particular, y cuando un aminoacil-ARNt se asocia a un codón específico.

22.9 Regulación de la síntesis de proteínas

Una forma en que puede regularse la expresión génica es controlando la traducción del ARNm a una proteína. El control de traducción puede ejercitarse durante el inicio, el

alargamiento o la terminación. En general, el control de la traducción de la expresión génica se usa para regular la producción de proteínas que se ensamblan en complejos de varias subunidades, y de proteínas cuya expresión en la célula debe controlarse en forma estricta y rápida.

Como en el caso de la transcripción, la velocidad de traducción depende, hasta cierto grado, de la secuencia en la plantilla. Por ejemplo, un ARNm que contenga abundancia de codones raros se traduce con menos rapidez (y por lo tanto con menos frecuencia) que uno que contenga los codones de uso más frecuente. Además, la velocidad de inicio de la traducción varía con la secuencia de nucleótidos en el sitio de inicio. Un sitio de unión fuerte con ribosoma en ARNm bacteriano conduce a una iniciación más eficiente. También hay pruebas de que la secuencia de nucleótidos que rodea al codón de inicio en ARNm eucariótico influye sobre la velocidad de iniciación.

Una diferencia entre el inicio de la traducción y el inicio de la transcripción es que la formación de un complejo de traducción puede verse influido por la estructura secundaria en el mensaje. Por ejemplo, la formación de regiones intramoleculares de doble hebra en el ARNm puede enmascarar a sitios de unión del ribosoma y al codón de inicio. Aunque las propiedades estructurales pueden determinar si una molécula dada de ARNm se traduce con mucha o poca frecuencia, en el sentido estricto eso no es regulación. Aquí se usará el término *regulación de traducción* para los casos donde los factores extrínsecos modulan la frecuencia de traducción del ARNm.

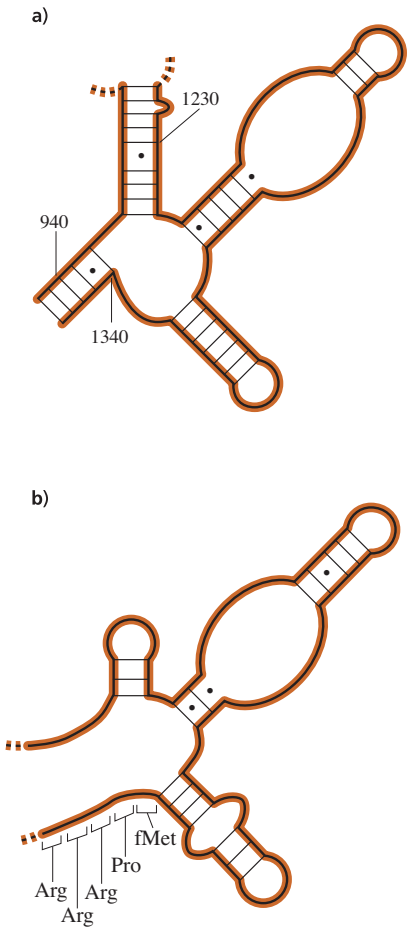


Figura 22.25 ▲
Comparación de las estructuras secundarias propuestas de los sitios de enlace S7. **a)** Sitio de enlace S7 en el ARNr 16S. **b)** Sitio de enlace S7 en la molécula de ARNm *str*.

A. Acoplamiento de la síntesis de proteína con el ensamble del ribosoma en *E. coli*

Todo ribosoma de *E. coli* contiene cuando menos 52 proteínas ribosómicas. Los genes que codifican estas proteínas ribosómicas están dispersos por el genoma de *E. coli*. Se encuentran en 13 operones diferentes, y en siete genes aislados. Cuando se insertan copias múltiples de genes que codifican algunas de esas proteínas ribosómicas en *E. coli*, aumentan bruscamente las concentraciones de los ARNm respectivos; sin embargo, apenas cambia la velocidad general de síntesis de proteínas ribosómicas. Además, las concentraciones relativas de las proteínas ribosómicas permanecen sin cambio, aun cuando las diversas moléculas de ARNm para proteínas ribosómicas estén presentes en cantidades distintas. Estas determinaciones parecen indicar que la síntesis de proteínas ribosómicas está regulada en forma estrecha a nivel de traducción.

La regulación de la traducción en la síntesis de proteína ribosómica es muy importante, porque los ribosomas no se pueden ensamblar a menos que estén presentes todas las proteínas en las proporciones estequiométricas correctas. La producción de proteínas ribosómicas se controla regulando la eficiencia con la que se traducen sus ARNm. Cada uno de los operones grandes que contienen genes de proteína ribosómica codifica una proteína ribosómica que inhibe la traducción de su propio ARNm policistrónico al unirse cerca del codón de inicio de uno de los primeros genes del operón.

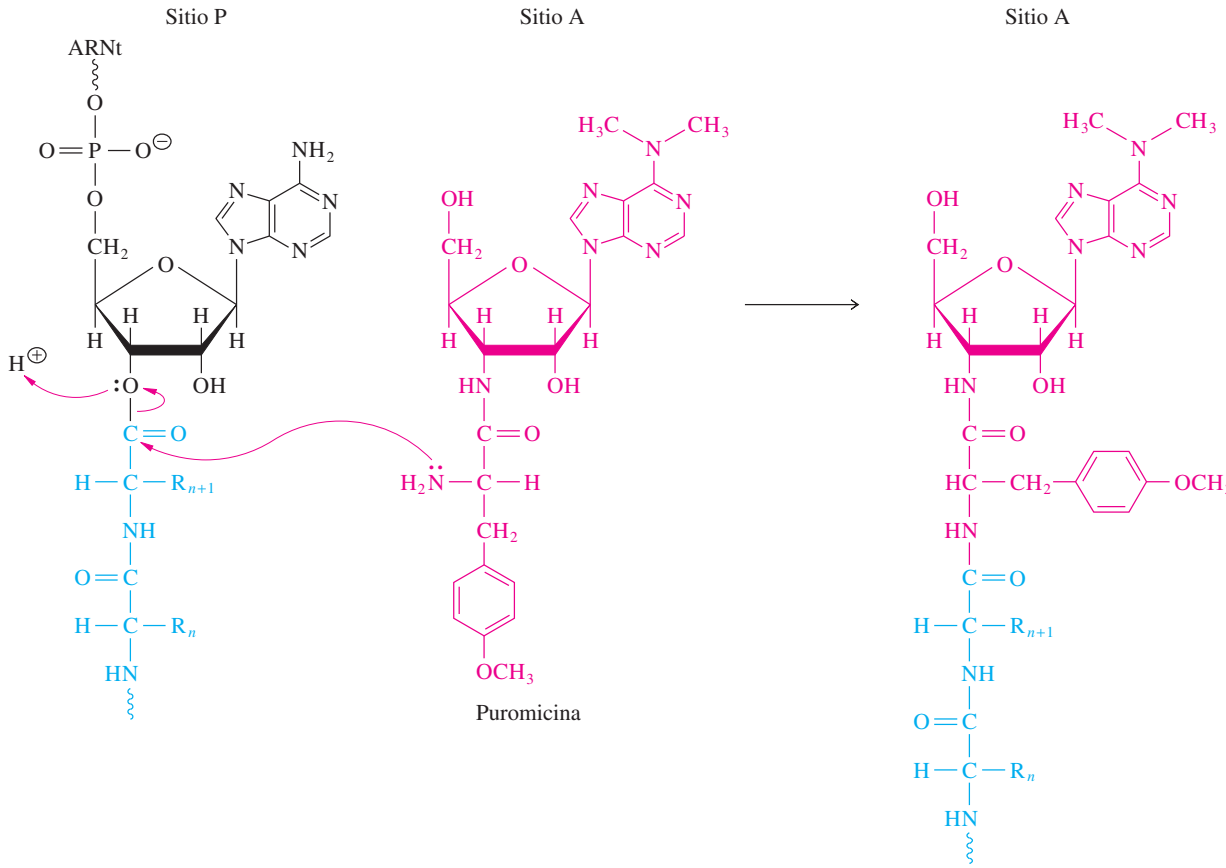
Las interacciones entre las proteínas ribosómicas inhibidoras y sus ARNm podrán parecerse a las que hay entre esas proteínas y el ARN ribosómico al que se unen cuando se ensamblan en ribosomas maduros. Por ejemplo, el ARNm transcrito del operón *str*, que incluye la región codificadora para la proteína ribosómica S7, contiene algunas regiones de secuencia de ARN que son idénticas al sitio de unión de S7 en el ARNr 16S. Es más, la estructura secundaria propuesta del ARNm *str* se parece a la estructura secundaria propuesta para el sitio de unión con el ARNr 16S (figura 22.25). S7 se une a esta región de la molécula del ARNm *str* e inhibe la traducción. Es probable que S7 reconozca características estructurales análogas en las dos moléculas de ARN. Mecanismos parecidos regulan la traducción del ARNm que codifican las demás proteínas ribosómicas.

Las proteínas ribosómicas que inhiben la traducción se unen con más fuerza al ARN ribosómico que a los sitios similares en el ARN mensajero. Así, el ARNm continúa traduciéndose mientras se incorporen proteínas ribosómicas recién sintetizadas a los ribosomas. Sin embargo, tan pronto como se desacelera el ensamble del ribosoma y aumenta la concentración de proteínas ribosómicas libres dentro de la célula, las proteínas ribosómicas inhibidoras se unen a sus propias moléculas de ARNm y bloquean más la síntesis de proteína. De esta forma se coordina la síntesis de proteínas ribosómicas con el ensamble del ribosoma.

RECUADRO 22.1 Algunos antibióticos inhiben la síntesis de proteínas

Muchos microorganismos producen antibióticos, que usan como defensa química contra competidores. Algunos antibióticos evitan el crecimiento bacteriano porque inhiben la formación de enlaces peptídicos. Por ejemplo, la estructura del antibiótico puromicina se parece mucho a la estructura del extremo 3′ de una molécula de aminoacil-ARNt. Por esta semejanza, la puromicina puede entrar al sitio A de un ribosoma. Entonces, la peptidil transferasa cataliza la transferencia del polipéptido naciente al grupo amino libre de la puromicina (véase la figura siguiente). El complejo peptidil-puromicina se une débilmente al sitio A y se disocia pronto del ribosoma, terminando así la síntesis de la proteína.

Aunque la puromicina bloquea con eficacia la síntesis de proteínas en los procariotas, no tiene uso clínico porque también la bloquea en los eucariotas, por lo que es tóxica para los humanos. Los antibióticos de importancia clínica, entre los que están estreptomicina, cloranfenicol, eritromicina y tetraciclina, son específicos para bacterias y tienen poco o ningún efecto sobre la síntesis de proteínas eucarióticas. La estreptomicina se une a una de las proteínas ribosomales en la subunidad 305, e inhibe el inicio de la traducción.El cloranfenicol interactúa con la subunidad 50S e inhibe la peptidil transferasa. La eritromicina se une a la subunidad 50S e inhibe el paso de traslocación. La tetraciclina se une a la subunidad 30S y evita la unión de moléculas de aminoacil-ARNt al sitio A.



▲ Formación de un enlace peptídico entre puromicina, en el sitio A de un ribosoma, y el péptido naciente unido al ARNt en el sitio P. El producto de esta reacción sólo se une débilmente en el sitio A y se disocia del ribosoma terminando así la síntesis de la proteína y produciendo un péptido incompleto e inactivo.

B. La síntesis de globina depende de la disponibilidad de hemo

La síntesis de hemoglobina, la principal proteína de los glóbulos rojos, requiere cadenas de globina y hemos en cantidades estequiométricas (sección 4.12). Una forma de controlar la síntesis de globina es regulando el inicio de la traducción. Al principio, la

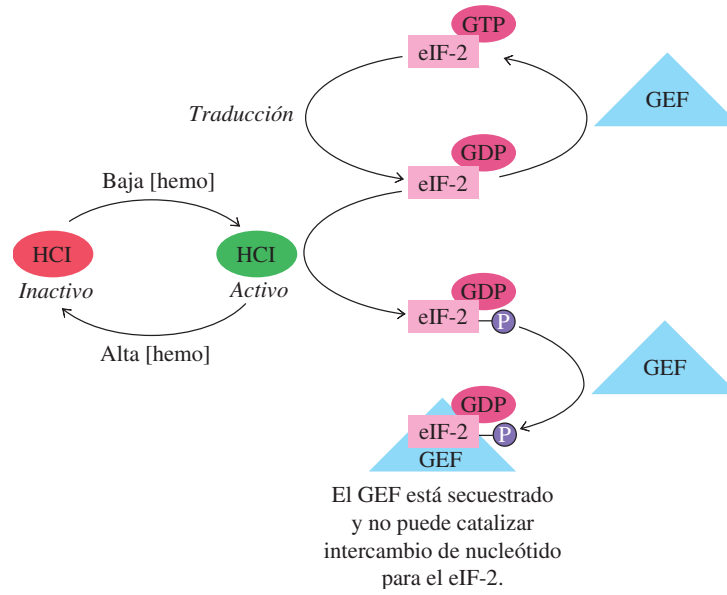


Figura 22.26 ▶
Inhibición de la síntesis de proteína por fosforilación de eIF-2 en reticulocitos. Cuando la concentración del hemo es alta, el HCI es inactivo y la traducción prosigue con normalidad. Cuando la concentración del hemo es baja, el HCI cataliza la fosforilación del eIF-2. El eIF-2 fosforilado se une con mucha fuerza a las cantidades limitantes de GEF en la célula y secuestra al GEF evitando la traducción de los ARNm celulares (incluyendo las globinas).

hemoglobina es sintetizada en eritrocitos inmaduros llamados rubriblastos. Los rubriblastos de mamíferos pierden su núcleo durante la maduración y al final se transforman en reticulocitos, los precursores inmediatos de los eritrocitos. La hemoglobina continúa sintetizándose en los reticulocitos, que están empacados con moléculas de ARNm procesadas y estables que codifican polipéptidos de globina.

La velocidad de síntesis de globina en los reticulocitos es determinada por la concentración de hemo; cuando baja esa concentración se inhibe la traducción del ARNm de globina. El efecto del hemo sobre la traducción del ARNm de globina es mediado por una proteína cinasa llamada inhibidor controlado por hemo (HCI, *hemo-controlled inhibitor*) (figura 22.26). El HCI activo, cataliza la transferencia de un grupo fosforilo del ATP al factor de iniciación eIF-2 de la traducción. El eIF-2 fosforilado no puede participar en el inicio de la traducción, y se inhibe la síntesis de proteína en la célula.

Durante el inicio de la traducción, el eIF-2 se une a metionil-ARNt_i^{Met} y GTP. Cuando el complejo de preinicio encuentra un codón de inicio, el metionil-ARNt_i^{Met} se transfiere del eIF-2 al codón de inicio del ARNm. Esta reacción de transferencia se acompaña por la hidrólisis de GTP y la liberación de eIF-2-GDP. Una enzima llamada factor de intercambio de guanina nucleótido (GEF, *guanine exchange factor*) cataliza el reemplazo de GDP con GTP en el eIF-2, y la fijación de otro metionil-ARNt_i^{Met} al eIF-2. El GEF se une muy fuertemente al eIF-2-GDP fosforilado, evitando la reacción de intercambio de nucleótido. La síntesis de proteína se inhibe por completo cuando todo el GEF en la célula está enlazado, porque no se puede regenerar el complejo activo eIF-2-GTP.

El hemo regula la síntesis de globina interfiriendo con la activación del HCI. Cuando el hemo es abundante, el HCI es inactivo y puede traducirse el ARNm en globina . Sin embargo, cuando el hemo es escaso, se activa el HCI y se inhibe la traducción de todo el ARNm dentro de la célula (figura 22.26). La fosforilación del eIF-2 al parecer también regula la traducción del ARNm en otros tipos de células de mamífero. Por ejemplo, durante la infección de células humanas por virus de ARN, la presencia de ARN de doble hebra causa la producción de interferón, lo que a su vez activa una proteína cinasa que fosforila el eIF-2. Esta reacción inhibe la síntesis de proteína en la célula infectada con virus.

C. El operón *trp* de *E. coli* está regulado por represión y atenuación

El operón *trp* en *E. coli* codifica las proteínas necesarias para la biosíntesis del triptófano. La mayoría de los organismos sintetizan sus propios aminoácidos, pero también

pueden obtenerlos degradando proteínas exógenas. Por esta razón, la mayor parte de los organismos han evolucionado mecanismos para reprimir la síntesis de las enzimas necesarias para la biosíntesis de aminoácidos *de novo* cuando el aminoácido está disponible en fuentes exógenas. Por ejemplo, en *E. coli* el triptófano es un regulador negativo de su propia biosíntesis. En presencia del triptófano, el operón *trp* no se expresa (figura 22.27). La expresión del operón *trp* es inhibida en parte por el represor *trp*, un dímero de dos subunidades idénticas. El represor *trp* es codificado por el gen *trp*R, que está en otro lugar del cromosoma bacteriano y se transcribe por separado. Cuando hay abundancia de triptófano, un complejo represor-triptófano se une al operador *trp*O, que está dentro del promotor. El complejo represor-triptófano enlazado evita que la ARN polimerasa se una al promotor. Por lo anterior, el triptófano es un correpresor del operón *trp*.

La regulación del operón *trp* de *E. coli* es suplementada y refinada por un segundo mecanismo independiente, llamado **atenuación**. Este segundo mecanismo depende de

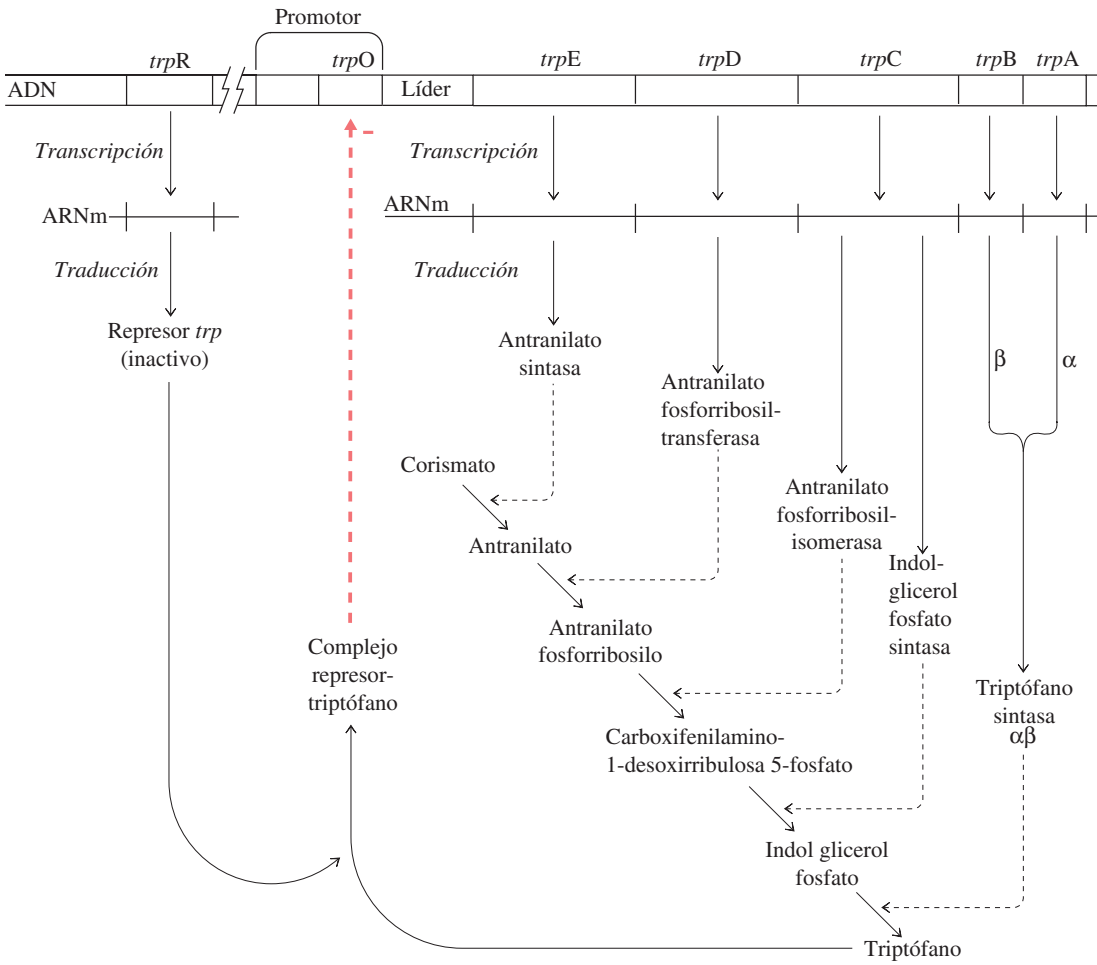


Figura 22.27 ▲
Represión del operón *trp* de *E. coli*. El operón *trp* está formado por una región líder y cinco genes necesarios para la biosíntesis de triptófano a partir de corismato. El gen *trp*R, ubicado antes del operón *trp* (*trp*O) codifica al represor *trp*, que es inactivo en ausencia de su correpresor, el triptófano. Cuando hay triptófano en exceso, se une al represor *trp* y el complejo represor-triptófano se une al operador *trp* (*trp*O). Una vez unido al operador, el complejo represor-triptófano evita más transcripción del operón *trp*, al excluir del promotor a la ARN polimerasa.

la traducción y ayuda a determinar si la transcripción del operón *trp* sigue o termina en forma prematura. El movimiento de la ARN polimerasa desde el promotor al gen *trp*E está gobernado por una secuencia de 162 nucleótidos que está entre el promotor y el *trp*E. Esta secuencia, llamada región líder (figura 22.27), incluye un tramo de 45 nucleótidos que codifica a un péptido de 14 aminoácidos llamado péptido líder. El ARNm transcrito de la región líder contiene dos codones consecutivos que especifican triptófano, cerca del extremo de la región codificadora para el péptido líder. Además, la región líder contiene cuatro secuencias ricas en GC. Los codones que especifican triptófano, y las cuatro secuencias ricas en GC, regulan la síntesis del ARNm afectando la terminación de la transcripción.

Cuando se transcriben al ARNm, las cuatro secuencias ricas en GC de la región líder pueden aparear las bases para formar una de dos estructuras secundarias alternativas (figura 22.28). La primera estructura secundaria posible tiene dos horquillas de ARN. Esas horquillas se forman entre las secuencias marcadas con 1 y 2 y entre las marcadas 3 y 4, en la figura 22.28a. La horquilla 1-2 es un sitio típico de pausa de transcripción. La horquilla 3-4 es seguida por una serie de residuos de uridilato, que es una señal típica de terminación independiente de rho (sección 21.4). Sin embargo, esta señal de terminación en particular es poco frecuente, porque está antes del primer gen en el operón *trp*. La otra estructura secundaria posible tiene una sola horquilla de ARN entre las secuencias 2 y 3. Esta horquilla, que es más estable que la 3-4, sólo se forma cuando la secuencia 1 no está disponible para formar una horquilla con la secuencia 2.

Durante la transcripción de la región líder, la ARN polimerasa hace pausa cuando se forma la horquilla 1-2, Mientras la ARN polimerasa hace la pausa, un ribosoma inicia la traducción del ARNm que codifica al péptido líder. Esta región de codificación comienza justo antes de la horquilla 1-2 de ARN. La secuencia 1 codifica los aminoácidos C-terminales del péptido líder, y también contiene un codón de terminación. Cuando el ribosoma traduce la secuencia 1, altera la horquilla 1-2 y con ello libera la ARN polimerasa que hacía la pausa, que entonces transcribe la secuencia 3. En presencia de triptofanil-ARNt^{Trp}, el ribosoma y la ARN polimerasa se mueven más o menos con la misma velocidad. Cuando el ribosoma encuentra al codón de terminación del ARNm de *trp* líder, se disocia, y se vuelve a formar la horquilla 1-2. Después de que se ha desensamblado el ribosoma, la ARN polimerasa transcribe la secuencia 4, que forma una horquilla de terminación de la transcripción con la secuencia 3. Esta señal de terminación hace que el complejo de transcripción se disocie de la plantilla de ADN antes que se hayan transcrito los genes del operón *trp*.

Sin embargo, cuando es escaso el triptófano, el ribosoma y la ARN polimerasa no se mueven al mismo tiempo. Cuando baja la concentración de triptófano celular, hay deficiencia de triptofanil-ARNt^{Trp}. Bajo estas condiciones, el ribosoma hace pausa el llegar a los dos codones que especifican triptófano en la secuencia 1 de la molécula de ARNm. La ARN polimerasa, que ya se ha soltado del sitio de pausa 1-2, transcribe las secuencias 3 y 4. Mientras que el ribosoma se para y se cubre la secuencia 1, la secuencia 2 forma un brazo de horquilla con la secuencia 3. Como la horquilla 2-3 es más estable que la horquilla 3-4, la secuencia 3 no se aparea con la secuencia 4 para formar la horquilla de terminación de transcripción. Bajo estas condiciones, la ARN polimerasa pasa por el sitio potencial de terminación (UGA en la figura 22.28a) y se transcribe el resto del operón *trp*.

Al parecer, la atenuación es un mecanismo regulador que ha evolucionado desde relativamente hace poco, y sólo se encuentra en las bacterias entéricas como *E. coli*. (La atenuación no puede existir en los eucariotas, porque la transcripción y la traducción suceden en distintas partes de la célula). Varios operones de *E. coli*, incluyendo los operones *phe, thr, hys, leu* e *ile* son regulados por atenuación. Algunos operones, como el operón *trp*, combinan atenuación con represión, en tanto que otros, como el operón *his*, sólo son regulados por atenuación. Los péptidos líder de los operones cuyos genes intervienen en la biosíntesis de aminoácidos pueden contener hasta siete codones que especifican determinado aminoácido.

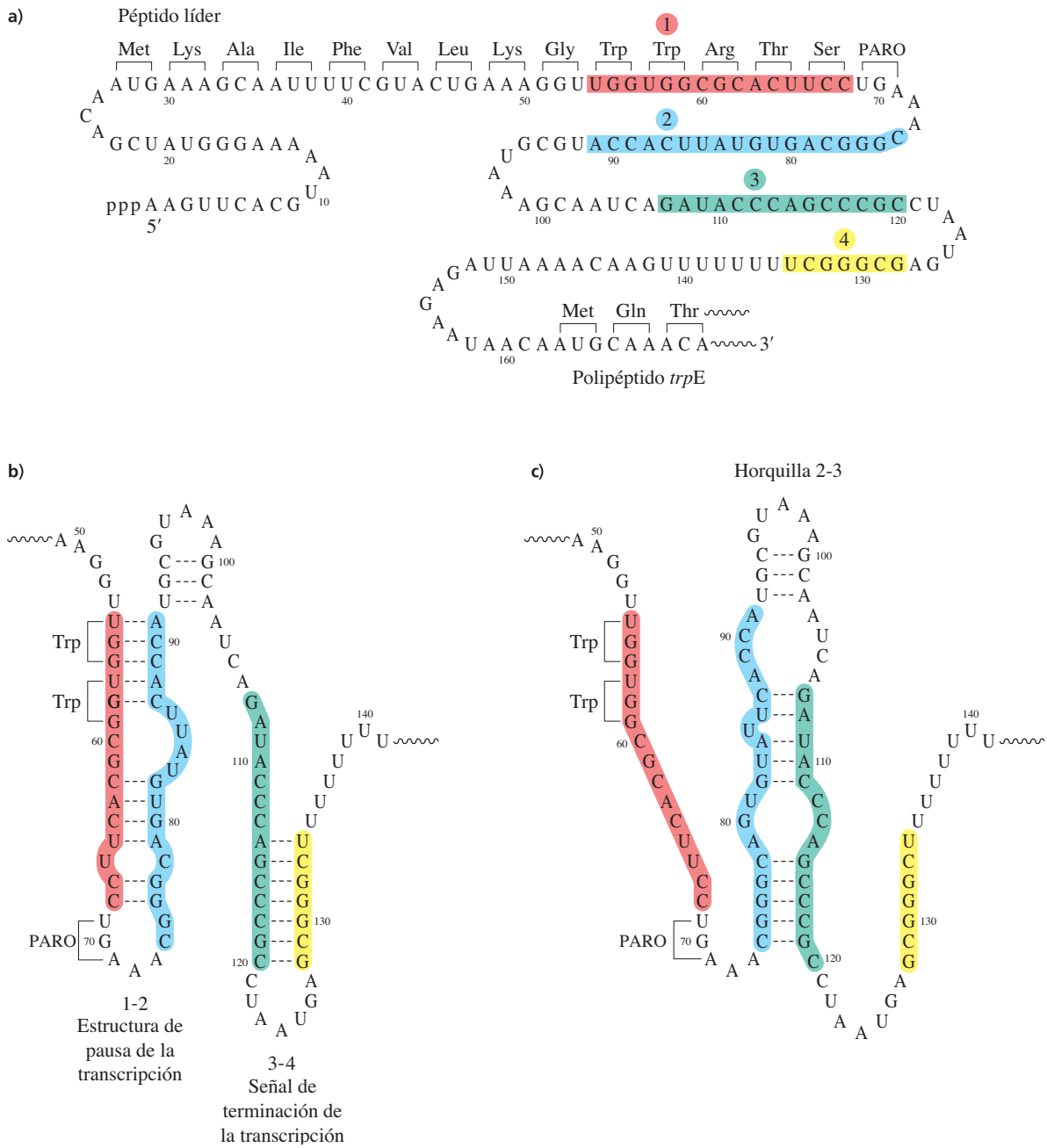


Figura 22.28 ▲
Región líder *trp*. **a)** ARNm transcrito de la región líder *trp*. Esta secuencia de ARNm de 162 nucleótidos contiene cuatro secuencias ricas en GC y la región codificadora para un péptido líder de 14 aminoácidos. La región codificadora incluye dos codones consecutivos que especifican triptófano. Las cuatro secuencias ricas en GC pueden aparear sus bases para formar una de dos estructuras secundarias alternativas. **b)** La secuencia 1 (roja) y la secuencia 2 (azul) son complementarias, y cuando se aparean sus bases forman un sitio de pausa de transcripción típico. La secuencia 3 (verde) y la secuencia 4 (amarilla) son complementarias, y cuando se aparean sus bases forman un sitio de terminación independiente de rho. **c)** También las secuencias 2 y 3 son complementarias y pueden formar una horquilla de ARN que es más estable que la horquilla 3-4. Esta estructura sólo se forma cuando la secuencia 1 no está disponible para la formación de horquilla con la secuencia 2. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

22.10 Procesamiento postraduccional

A medida que el complejo de traducción se mueve a lo largo de la plantilla de ARNm en la dirección 5′ → 3′, se alarga la cadena naciente de polipéptido. Los más o menos 30 residuos de aminoácido polimerizados más recientemente permanecen ocultos en el ribosoma, pero los residuos de aminoácido más cercanos al N-terminal son expulsados del ribosoma. Estos residuos N-terminales comienzan a doblarse formando la estructura nativa de la proteína, aun antes de que se haya sintetizado el C-terminal de la proteína. A medida que se doblan estos residuos, sobre ellos actúan enzimas que modifican la cadena naciente.

Las modificaciones que ocurren antes de que esté completa la cadena de polipéptido se llaman **cotraduccionales**, en tanto que las que se producen después de que está terminada la cadena se llaman **postraduccionales**. Algunos ejemplos de las múltiples modificaciones cotraduccionales y postraduccionales incluyen la desformilación del residuo N-terminal en proteínas procarióticas, eliminación de la metionina N-terminal en proteínas procarióticas y eucarióticas, la formación de puentes disulfuro, la división por proteinasas, la fosforilación, la adición de residuos de carbohidrato y la acetilación.

Uno de los eventos más importantes que suceden cotraduccional y postraduccionalmente es el procesamiento y transporte de proteínas a través de las membranas. La síntesis de proteína sucede en el citosol, pero las formas maduras de muchas proteínas están incrustadas en las membranas, o están dentro de compartimientos unidos a la membrana. Por ejemplo, muchas proteínas receptoras están embebidas en la membrana externa de la célula, con la mayor parte de la proteína fuera de ella. Otras proteínas son secretadas de las células y otras más residen en lisosomas y en otros organelos dentro de las células eucarióticas. En cada caso, la proteína sintetizada en el citosol debe ser transportada a través de una barrera de membrana. De hecho, esas proteínas son sintetizadas por ribosomas unidos a membranas, que están fijos a la membrana plasmática en las bacterias y al retículo endoplásmico en las células eucarióticas.

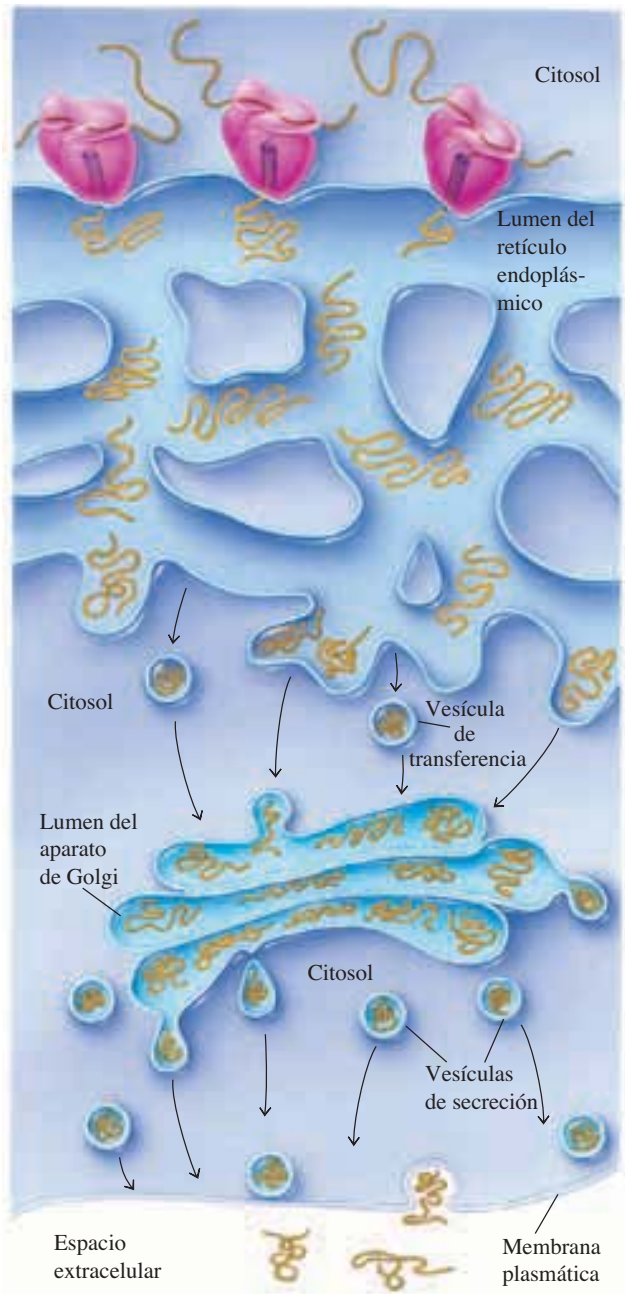
El sistema de transporte mejor caracterizado es el que lleva las proteínas del citosol a la membrana plasmática, para secretarlos (figura 22.29). En los eucariotas, las proteínas destinadas a la secreción son transportadas a través de la membrana del retículo endoplásmico en el interior del lumen, que equivale topológicamente al exterior de la célula. Una vez transportada la proteína dentro del retículo endoplásmico, puede ser transportada mediante vesículas, a través del aparato de Golgi, a la membrana plasmática para liberarla fuera de la célula.

A. La hipótesis de la señal

Las proteínas secretadas se sintetizan en la superficie del retículo endoplasmático, y la proteína recién sintetizada atraviesa la membrana y va al lumen. En células que producen grandes cantidades de proteína secretada, las membranas del retículo endoplásmico están cubiertas con ribosomas (figura 22.30, página 714).

La clave para el proceso por el cual muchas proteínas cruzan la membrana del retículo endoplásmico aparece en los más o menos primeros 20 residuos de la cadena de polipéptido naciente. En la mayor parte de las proteínas unidas a membrana y secretadas, esos residuos sólo existen en el polipéptido naciente, y no en la proteína madura. La secuencia de residuos N-terminal que se elimina proteolíticamente del precursor de la proteína se llama **péptido señal**, porque es la parte del precursor que da la señal de que la proteína cruce una membrana. Los péptidos de señal varían en su longitud y composición, pero en forma típica tienen de 16 a 30 residuos de longitud, y contienen 4 a 15 residuos hidrofóbicos (figura 22.31, página 714).

En los eucariotas, parece que muchas proteínas destinadas a ser secretadas se traslocan a través del retículo endoplásmico por la ruta que se ve en la figura 22.32, en la página 715. En el primer paso, se forma en el citosol un complejo de iniciación 80S, que incluye un ribosoma, una molécula de Met-ARNt_i^{Met} y una de ARNm. A continuación, el ribosoma comienza a traducir el ARNm y a sintetizar el péptido señal en el N-terminal del precursor. Una vez sintetizado el péptido señal, y ya expulsado del ribosoma, se



◀Figura 22.29
Ruta de secreción en células eucarióticas. Las proteínas cuya síntesis se inicia en el citosol se transportan al lumen del retículo endoplásmico. Después de más modificaciones en el aparato de Golgi, las proteínas son secretadas. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

une a un complejo de proteína-ARN llamado partícula de reconocimiento de señal (SRP, *signal recognition particle*).

La SRP es una ribonucleoproteína pequeña que contiene una molécula de ARN de 300 nucleótidos, llamada 7SL ARN, y cuatro proteínas. La SRP reconoce y se une al péptido señal a medida que emerge del ribosoma. Cuando se une la SRP se bloquea la continuación de la traducción. Entonces, el complejo SRP-ribosoma se une a una proteína receptora de SRP (que también se llama proteína de acoplamiento) en la cara del retículo endoplásmico que da al citosol. El ribosoma se ancla a la membrana del retículo endoplásmico por las proteínas enlazantes con ribosoma llamadas translocones, y el péptido señal se inserta en la membrana en un poro que es parte del complejo que forman las proteínas del retículo endoplásmico en el sitio de acoplamiento. Una vez que el complejo ribosoma-SRP se une a la membrana, se restablece la inhibición de la traducción

Figura 22.30 ▶
Vesículas secretoras en una célula de cubierta de raíz de maíz. Unas vesículas secretoras grandes conteniendo proteínas forman yemas y salen del aparato de Golgi (centro). Nótese la abundancia de ribosomas unidos al retículo endoplásmico.

y la SRP se disocia en una reacción acoplada a la hidrólisis GTP. Por lo tanto, el papel de la SRP consiste en reconocer a los polipéptidos nacientes que contienen péptido señal y dirigir el complejo de traducción hacia la superficie del retículo endoplásmico.

Una vez que el complejo de traducción se enlaza a la membrana, se reinicia la traducción y la nueva cadena de polipéptido pasa a través de la membrana. El péptido señal se divide entonces del polipéptido naciente mediante una peptidasa de señal, una proteína

prelisozima

$H_3\overset{\oplus}{N}$-Met–Arg–Ser–Leu–Leu–Ile–Leu–Val–Leu–Cys–Phe–Leu–Pro–Leu–Ala–Ala–Leu–Gly↓–Gly ∿∿

Preproalbúmina

$H_3\overset{\oplus}{N}$-Met–Lys–Trp–Val–Thr–Phe–Leu–Leu–Leu–Leu–Phe–Ile–Ser–Gly–Ser–Ala–Phe–Ser↓–Arg ∿∿

Fosfatasa alcalina

$H_3\overset{\oplus}{N}$-Met–Lys–Gln–Ser–Thr–Ile–Ala–Leu–Ala–Leu–Leu–Pro–Leu–Leu–Phe–Thr–Pro–Val–Thr–Lys–Ala↓–Arg ∿∿

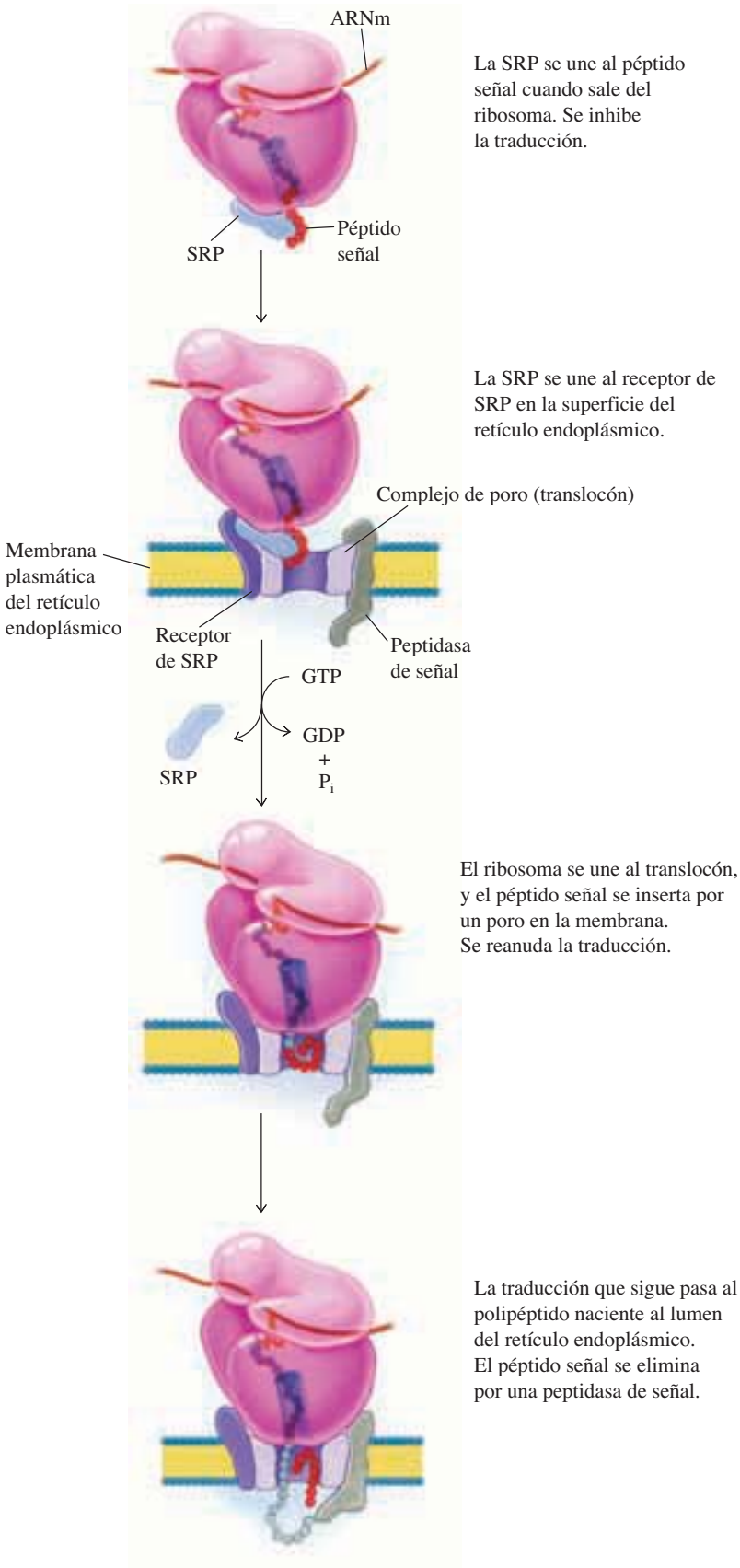
Proteína enlazada a maltosa

$H_3\overset{\oplus}{N}$-Met–Lys–Ile–Lys–Thr–Gly–Ala–Arg–Ile–Leu–Ala–Leu–Ser–Ala–Leu–Thr–Thr–Met–Met–Phe–Ser–Ala–Ser–Ala–Leu–Ala↓–Lys ∿∿

OmpA

$H_3\overset{\oplus}{N}$-Met–Lys–Lys–Thr–Ala–Ile–Ala–Ile–Ala–Val–Ala–Leu–Ala–Gly–Phe–Ala–Thr–Val–Ala–Gln–Ala↓–Ala ∿∿

Figura 22.31 ▲
Péptidos de señal a partir de proteínas secretadas. Los residuos hidrofóbicos están en gris, y las flechas marcan los sitios donde se separa el péptido señal del precursor. (OmpA es una proteína de membrana bacteriana).



◀Figura 22.32
Traslocación de proteínas eucarióticas al lumen del retículo endoplásmico. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

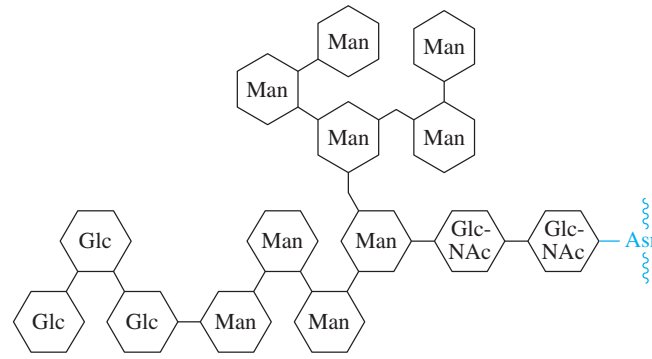


Figura 22.33 ▶
Estructura de un oligosacárido complejo unido a un residuo de asparagina. Abreviaturas: Glc, glucosa; GlcNAc, *N*-acetilglucosamina; Man, manosa.

integral de membrana asociada al complejo del poro. El transporte de las proteínas a través de la membrana es asistido por chaperonas en el lumen del retículo endoplásmico. Además de su papel en el plegado de la proteína, se requieren chaperonas para la traslocación, y su actividad necesita de la hidrólisis del ATP. Cuando termina la síntesis de la proteína, el ribosoma se disocia del retículo endoplásmico y se desensambla el complejo de traducción.

B. Glicosilación de proteínas

Muchas proteínas integrales de membrana y proteínas de secreción contienen cadenas de oligosacárido unidas en forma covalente. La adición de esas cadenas a las proteínas se llama glicosilación de la proteína (sección 8.7C). La glicosilación de la proteína es una de las principales actividades metabólicas del lumen del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi, y es una extensión del proceso general de la biosíntesis de la proteína. Una glicoproteína puede contener docenas, en realidad cientos, de unidades de monosacárido. La masa de la parte de carbohidrato puede ser desde 1% o hasta 80% de la masa de la glicoproteína.

Una reacción común de glicosilación consiste en la fijación covalente de un oligosacárido complejo a la cadena lateral de un residuo de asparagina (figura 22.33). Durante el tránsito posterior por el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, las proteínas se pueden modificar covalentemente en muchas formas, como la formación de puentes disulfuro y la ruptura proteolítica. Los oligosacáridos complejos unidos a las proteínas también se modifican durante su tránsito. Una diversidad de oligosacáridos diferentes se pueden unir en forma covalente a las proteínas. En algunos casos, la estructura del oligosacárido actúa como señal de dirección de las proteínas hacia un lugar específico. Por ejemplo, las proteínas del lisosoma contienen sitios para la fijación de un oligosacárido, que conducen a esas proteínas al lisosoma. Para cuando han atravesado el aparato de Golgi, las proteínas y sus oligosacáridos suelen estar ya totalmente modificadas.

Resumen

1. El código genético consiste en codones de tres nucleótidos, no sobrepuestos. El código no es ambiguo y es degenerado; con frecuencia bastan los dos primeros nucleótidos del código de tres letras. Los codones con secuencias similares especifican aminoácidos químicamente similares y hay codones especiales para el inicio y la terminación de la síntesis del péptido.
2. Las moléculas de ARNt son los adaptadores entre los codones del ARNm y los aminoácidos de las proteínas. Todas las moléculas de ARNt tienen una estructura secundaria similar en forma de trébol, con un tallo y tres brazos. La estructura terciaria tiene forma de L. El brazo de anticodón está en un extremo de la estructura, y el tallo aceptor en el otro. El anticodón en el ARNt aparea sus bases con las de un codón en el ARNm. La posición 5′ (de tambaleo) del anticodón es de conformación flexible.

3. La aminoacil-ARNt sintetasa cataliza la adición de un aminoácido específico al tallo aceptor del ARNt adecuado, produciendo un aminoacil-ARNt. Algunas aminoacil-ARNt sintetasas sólo hacen corrección de pruebas.

4. Los ribosomas son los complejos de ARN-proteína que catalizan la polimerización de aminoácidos unidos a moléculas de aminoacil-ARNt. Todos los ribosomas están formados por dos subunidades; los ribosomas procarióticas contienen tres moléculas de ARNr y los eucarióticos contienen cuatro. La cadena creciente de polipéptido se fija a un ARNt en el sitio peptidilo (P) del ribosoma, y la molécula de aminoacil-ARNt que tiene el siguiente aminoácido por añadir a la cadena naciente de polipéptido se acopla al sitio aminoacilo (A).

5. La traducción comienza con la formación de un complejo de iniciación formado por un ARNt iniciador, la plantilla de ARNm, las subunidades ribosómicas y varios factores de iniciación. En los procariotas, la iniciación sucede justo adelante de las secuencias de Shine-Dalgarno; en los eucariotas, la iniciación suele ocurrir en el codón de inicio más cercano al extremo 5′ del ARNm.

6. El paso de alargamiento en la traducción requiere proteínas accesorias, llamadas factores de alargamiento. Los tres pasos del alargamiento son: 1) posicionamiento del aminoacil-ARN correcto en el sitio A, 2) formación del enlace peptídico por peptidil transferasa y 3) traslocación del ribosoma en un codón.

7. Los factores de liberación reconocen a los codones de terminación y catalizan la terminación de la síntesis de la proteína y el desensamble del complejo de traducción.

8. En la síntesis de proteínas se requiere la energía de cuatro enlaces fosfoanhídrido por residuo.

9. La regulación de la traducción incluye la formación de la estructura secundaria en el ARNm que influye sobre la velocidad de iniciación. Las proteínas de ARN ribosómico pueden inhibir la traducción de su propio ARNm uniéndose a esos sitios. La fosforilación de un factor de iniciación regula la síntesis de globina. En la regulación de la expresión del operón trp en E. coli interviene la atenuación, en donde la traducción de un ARNm líder gobierna la transcripción del operón.

10. Muchas proteínas se modifican postraduccionalmente. Algunas proteínas eucarióticas destinadas a ser secretadas contienen señales N-terminales para su transporte al retículo endoplásmico. Muchas proteínas de membrana y secretadas son glicosiladas.

Problemas

1. El código genético estándar se lee en codones de tres nucleótidos de longitud. ¿Cuántos marcos de lectura potenciales hay en un solo tramo de ADN de doble hebra? Si en lugar de que el código genético se leyera en codones fuera de cuatro nucleótidos de longitud ¿cuántos marcos de lectura habría en el mismo tramo de ADN de doble hebra?

2. Examine las secuencias de los ARNm transcritos de la secuencia de ADN en el problema 11, capítulo 21. Suponga que el segmento de ADN es de la mitad de un gen codificador de proteína. ¿Cuál de los ARNm posibles es con más probabilidad el transcrito real? ¿Cuál es la secuencia del péptido codificado?

3. Calcule la cantidad de enlaces fosfoanhídrido que se hidrolizan durante la síntesis de una proteína de 600 residuos de aminoácidos en *E. coli*. No incluya la energía necesaria para sintetizar los aminoácidos, el ARNm, el ARNt o los ribosomas.

4. El alargamiento de la cadena de polipéptido en el ribosoma se puede dividir en tres pasos discretos (el microciclo): 1) unión del aminoacilo-ARNt correcto en el sitio A del ribosoma, 2) formación del enlace peptídico y 3) traslocación. En forma específica, ¿qué es lo que se trasloca en el tercer paso de este ciclo?

5. Un ARNm procariótico puede contener muchos codones AUG. ¿Cómo distingue el ribosoma los codones AUG que especifican el inicio, de los codones AUG que especifican metionina interna?

6. Si el código genético es universal, el RNAm de una planta ¿se traduciría en forma correcta en una célula procariótica como una de *E. coli*?

7. Los genomas bacterianos suelen contener varias copias de los genes para ARNr. Se transcriben con mucha eficacia para producir grandes cantidades de ARNr para ensamblarse en los ribosomas. En contraste, los genes que codifican proteínas ribosómicas sólo están presentes como copias únicas. Explique la diferencia en la cantidad de copias de genes de ARNr y de proteína ribosómica.

8. Las mutaciones supresoras restringen los efectos de otras mutaciones. Por ejemplo, las mutaciones que producen el codón de paro UAG en la parte media de un gen se suprimen por una mutación adicional en un gen de ARNt que da lugar a un anticodón mutante con la secuencia CUA. En consecuencia, un aminoácido se inserta en el codón de paro mutante y se sintetiza una proteína (aunque pueda ser sólo parcialmente activa). Escriba todas las especies de ARNt que podrían ser mutadas para un supresor de mutaciones UAG por un solo cambio de base en el anticodón. ¿Cómo sobrevive una célula con un ARNt supresor?

9. Los ARN de transferencia son absolutamente esenciales para la síntesis de polipéptidos. Después de repasar el material de este capítulo, indique cinco componentes celulares distintos que se puedan unir (interactuar con) a moléculas de ARNt.

10. En raras ocasiones, la maquinaria de traducción se encuentra con un codón que no se puede interpretar con rapidez, por falta de un determinado ARNt o factor de liberación. En esos casos, el ribosoma puede hacer una pausa y a continuación desplazarse en un solo nucleótido, y comenzar a traducir un marco diferente de lectura. Ese caso se conoce como desplazamiento de marco en traducción. El factor de liberación RF-2 de *E. coli* que se traduce del ARNm que contiene un codón interno de paro UGA, se produce por desplazamiento de marco de traducción. Explique cómo este fenómeno podría regular la producción de RF-2.

11. El mecanismo de atenuación requiere la presencia de una sección líder. Indique cuál será el efecto de los cambios siguientes sobre la regulación del operón *trp*:
a) Se omite toda la región líder.
b) Se omite la secuencia que codifica al péptido líder.
c) Hay mutación en la región líder, en un codón AUG.

12. En el capítulo 21 se indicaron muchos mecanismos de regulación que controlan la transcripción del operón *lac* en *E. coli*. En el capítulo 22, uno de los mecanismos de regulación de la traducción se llamó atenuación. ¿Cree que en algunas otras especies bacterianas el operón *lac* podría haber evolucionado en tal forma que se usara un mecanismo de atenuación para regular los niveles de expresión a partir de este operón?

13. En los operones que contienen genes para la biosíntesis de isoleucina, las regiones líder que anteceden a los genes contienen múltiples codones que no sólo especifican isoleucina, sino también valina y leucina. Sugiera una razón de que eso sea así.

14. Sugiera los pasos para la síntesis y el procesamiento de una proteína integral de membrana, glicosilada, eucariótica, con un dominio citosólico C-terminal y un dominio extracelular N-terminal.

15. En el capítulo 23 se describirán las técnicas de ADN recombinante que permiten cortar y pegar genes a voluntad. Si pudiera quitar la región codificadora para una secuencia de señal de secreción de una proteína, y colocarla de tal modo que ocupe ahora el *N*-terminal de una proteína citosólica (como β-galactosidasa) ¿esperaría que la nueva proteína híbrida entrara a la ruta de secreción celular?

16. En algunas especies de bacterias, el codón GUG inicia la síntesis de proteína (por ejemplo, LacI, figura 22.17a). Las proteínas completadas contienen siempre metionina en el *N*-terminal. ¿Cómo puede aparear sus bases el ARNt iniciador con el codón GUG? ¿Cómo se relacionaría este fenómeno con el tambaleo?

Lecturas seleccionadas

Aminoacil-ARNt sintetasas

Carter, C. W., Jr. (1993). Cognition, mechanism, and evolutionary relationships in aminoacyl-tRNA synthetases. *Annu. Rev. Biochem*. 62:715-748.

Ibba, M. y Söll, D. (2000). Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem*. 69:617-650.

Jakubowski, H. y Goldman, E. (1992). Editing of errors in selection of amino acids for protein synthesis. *Microbiol. Rev.* 56:412-429.

Kurland, C. G. (1992). Translational accuracy and the fitness of bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 26:29-50.

Schimmel, P. y Ribas de Pouplana, L. (2000). Footprints of aminoacyl-tRNA synthetases are everywhere. *Trends Biochem. Sci.* 25:207-209.

Ribosomas y traducción

Moore, P. B. y Steitz, T. A. (2003). The structural basis of large ribosomal subunit function. *Annu. Rev. Biochem.* 72:813-850.

Ban, N., Nissen, P., Hansen, J. Moore, P. B. y Steitz, T. A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* 289:905-919.

Carter, A. P., Clemons, W. M., Brodersen, D. E., Morgan-Warren, R. J., Wimberly, B. T. y Ramakrishnan, V. (2000). Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* 407:340-348.

Garrett, R. A., Douthwate, S. R., Matheson, A. T., Moore, P. B. y Noller, H. F., eds. (2000). *The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics, and Cellular Interactions* (Washington, D C: American Society for Microbiology).

Kawashima, T., Berthet-Colominas, C., Wulff, M., Cusack, S. y Leberman, R. (1996). The structure of the *Escherichia coli* EF-Tu·EF-Ts complex at 2.5 Å resolution. *Nature* 379:511-518.

Noller, H. F. (1993). Peptidyl transferase: protein, ribonucleoprotein, or RNA? *J. Bacteriol.* 175:5297-5300.

Pestova, T. V. y Hellen, C. U. T. (1999). Ribosome recruitment and scanning: what's new? *Trends Biochem. Sci.* 24:85-87.

Regulación de la traducción

Kozak, M. (1992). Regulation of translation in eukaryotic systems. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8:197-225.

McCarthy, J. E. G. y Gualerzi, C. (1990). Translational control of prokaryotic gene expression. *Trends Genet.* 6:78-85.

Merrick, W. C. (1992). Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiol. Rev.* 56:291-315.

Rhoads, R. E. (1993). Regulation of eukaryotic protein synthesis by initiation factors. *J. Biol. Chem*. 268:3017-3020.

Samuel, C. E. (1993). The eIF-2a protein kinases, regulators of translation in eukaryotes from yeasts to humans. *J. Biol. Chem.* 268:7603-7606.

Modificación postraduccional

Hurtley, S. M. (1993). Hot line to the secretory pathway. *Trends Biochem. Sci.* 18:3-6.

Parodi, A. J. (2000). Protein glycosylation and its role in protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* 69:69-93.

23

capítulo
veintitrés

Tecnología del ADN recombinante

Gran parte de la bioquímica que se explicó en los cuatro capítulos anteriores fue sobre la estructura y funciones de proteínas y ARN purificados. La tecnología para purificar estos componentes celulares se ha desarrollado a través de muchas décadas. Ahora se ha entrado a la era de la bioquímica donde el desarrollo de métodos para aislar, manipular y amplificar secuencias identificables de ADN permite estudiar la estructura y funciones de genes individuales. Esas metodologías tienen el nombre colectivo de **tecnología del ADN recombinante**, y han demostrado ser extremadamente poderosas cuando se aplican al estudio de sistemas biológicos.

Además de su uso más frecuente como herramienta de investigación básica, la tecnología del ADN recombinante, conocida como ingeniería genética, tiene numerosas aplicaciones prácticas. Algunas personas encuentran que éstas son excitantes e inspiradoras; otras las encuentran alarmantes. Sin embargo, durante los últimos 30 años las ventajas de esta tecnología, como mayor conocimiento de los procesos celulares básicos, mejores productos para diagnóstico y terapéutica, y cultivos más resistentes, en general se considera que superan a los riesgos, que incluyen la posibilidad de que especies o virus modificados sean perjudiciales y que afecten al ecosistema actual.

23.1 Preparación del ADN recombinante

Las moléculas de ADN que se preparan con ADN de diferentes procedencias se llaman **moléculas de ADN recombinante**. Estas moléculas son creadas en la naturaleza con más frecuencia que en el laboratorio; por ejemplo, cada vez que un bacteriófago o virus eucariótico infecta su célula huésped e integra su ADN al genoma huésped, se crea un recombinante. A veces, esos virus toman un fragmento de ADN huésped cuando se separan del genoma de su huésped; esas moléculas de ADN recombinante natural se han usado para estudiar algunos genes. A mediados de la década de 1970 se desarrollaron

Arriba: Semillas de guisantes, genéticamente modificadas. Las de la derecha se han modificado para ser más resistentes contra las larvas de gorgojo, que las semillas de tipo silvestre de la izquierda.

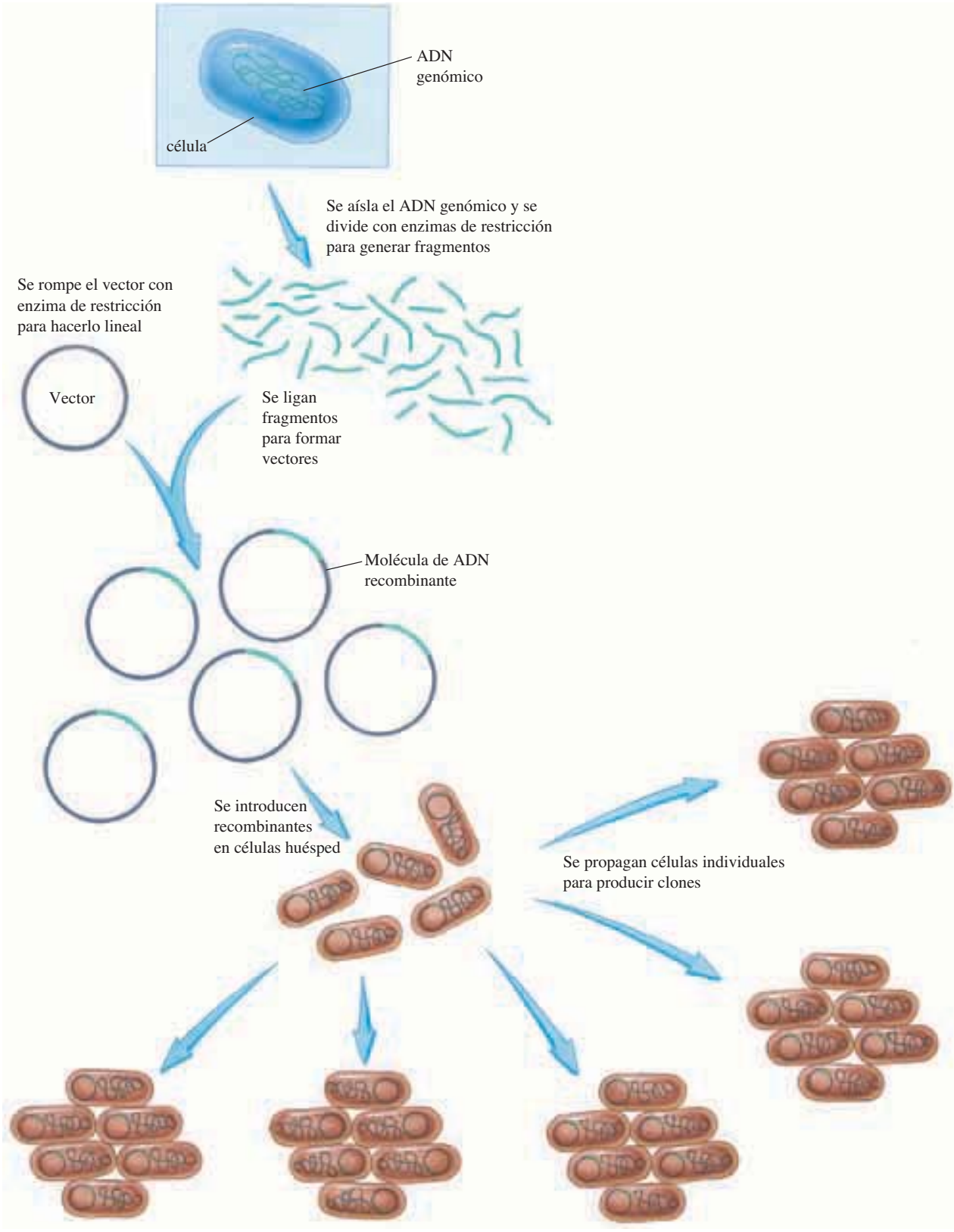


Figura 23.1 ▲
Pasos básicos en la generación de una molécula de ADN recombinante.

métodos de laboratorio más poderosos y más generales para identificar y aislar a un determinado gen.

La figura 23.1 muestra los pasos generales para preparar una molécula de ADN recombinante en el laboratorio. El ADN del genoma se rompe en pequeños fragmentos tratándolo con endonucleasas de restricción (sección 19.6C). Cada fragmento de ADN se inserta en un sitio compatible de una molécula portadora o **vector**. El ADN recombinante puede introducirse entonces en una célula huésped viva, donde se replica. La propagación de las células huéspedes individuales que contienen la molécula de ADN recombinante se llama clonación, aunque el término *clonación* se usa con frecuencia para indicar todo el proceso de construcción y propagación de una molécula de ADN recombinante. (En forma clásica, el término *clon* indica una réplica genética exacta). Cada línea clonal de células contiene, típicamente, muchas copias de un solo fragmento de ADN del genoma original. Se pueden preparar miles de millones de copias de cada fragmento cultivando las distintas líneas celulares. Si un fragmento contiene un gen que está expresado, en cada célula se pueden hacer miles de copias del gen producido. Al optimizar el crecimiento y la expresión (incluyendo el escalamiento) se podrían cosechar miligramos de determinado producto genético.

Hay seis pasos básicos comunes en la mayor parte de los experimentos con ADN recombinante.

1. *Aislamiento y purificación del ADN*. Se preparan moléculas de ADN vector y objetivo mediante diversos métodos sistemáticos, que no se describen aquí. En algunos casos, el ADN objetivo se sintetiza in vitro.
2. *División del ADN en secuencias particulares*. Como se verá, la rotura del ADN para generar fragmentos de longitud definida, o con extremos específicos, es básica en la tecnología de ADN recombinante. El fragmento de ADN de interés se llama *inserto* de ADN. En el laboratorio, el ADN suele dividirse tratándolo con nucleasas y endonucleasas de restricción comerciales.
3. *Ligadura de fragmentos de ADN*. Se suele formar una molécula de ADN recombinante dividiendo el ADN de interés para producir ADN de inserción para entonces ligar el ADN de inserción al ADN vector. Típicamente, los fragmentos de ADN se unen usando ADN ligasa (que también es comercial).
4. *Introducción de ADN recombinante en las células huésped compatibles*. Para propagarse, la molécula de ADN recombinante (ADN de inserción unida a ADN vector) debe introducirse en una célula huésped compatible donde se pueda replicar. A la integración directa de ADN por una célula huésped se le llama **transformación genética** (o sólo transformación). El ADN recombinante también se puede empacar en partículas virales y transferirse a las células huésped por transfección.
5. *Replicación y expresión del ADN recombinante en células huésped*. Los vectores de clonación permiten insertar el ADN por replicar, y en algunos casos expresarlo en una célula huésped. La capacidad de clonar y expresar ADN con eficiencia depende de la elección de los vectores y huéspedes adecuados.
6. *Identificación de células huésped que contienen el ADN recombinante de interés*. Los vectores suelen contener marcadores genéticos o genes de fácil detección, que permiten seleccionar células de huésped que han tomado ADN ajeno. La identificación de determinado fragmento de ADN suele implicar un paso adicional: clasificar una gran cantidad de clones de ADN recombinante. Casi siempre este es el paso más difícil.

▲Stanley N. Cohen (1935-) y Herbert Boyer (1936-) elaboraron el primer ADN recombinante usando ADN bacteriano y plásmidos.

23.2 Vectores de clonación

Los vectores de clonación pueden ser plásmidos, bacteriófagos, virus o incluso cromosomas artificiales pequeños. La mayor parte de los vectores contienen secuencias que les permiten replicarse en forma autónoma dentro de una célula anfitriona compatible,

en tanto que una pequeña parte contiene secuencias que facilitan la integración al genoma huésped. Todos los vectores de clonación tienen en común al menos un sitio único de clonación, una secuencia que se puede cortar con una endonucleasa de restricción para permitir la inserción específica de sitio de ADN ajeno. Los vectores más útiles tienen varios sitios de restricción agrupados en un sitio de clonación múltiple llamado *poliligador*.

Los fragmentos de ADN que se insertarán a un vector se pueden generar mediante una diversidad de métodos. Por ejemplo, se pueden producir por corte mecánico de moléculas largas de ADN, o digiriendo ADN con endonucleasas de restricción tipo II. A diferencia del corte, que rompe el ADN al azar, las enzimas de restricción dividen al ADN en secuencias específicas. Para fines de clonación, esta especificidad tiene ventajas extraordinarias.

Las endonucleasas de restricción más útiles producen fragmentos con extensiones de una hebra en sus extremos 3′ o 5′. Estos extremos, llamados extremos cohesivos, pueden aparear sus bases en forma transitoria con extremos cohesivos complementarios en ADN del vector y se pueden unir en forma covalente al vector en una reacción catalizada por ADN ligasa (figura 23.2). Así, las clases más simples de ADN recombinante son las que se preparan digiriendo los ADN vector y objetivo con la misma enzima, porque los fragmentos que resultan se pueden unir en forma directa por ligamiento. Aunque la inserción de fragmentos de ADN con extremos cohesivos complementarios es el método más eficiente, es posible insertar otros fragmentos de ADN objetivo. En esos casos, los extremos cohesivos del vector deben modificarse en reacciones separa-

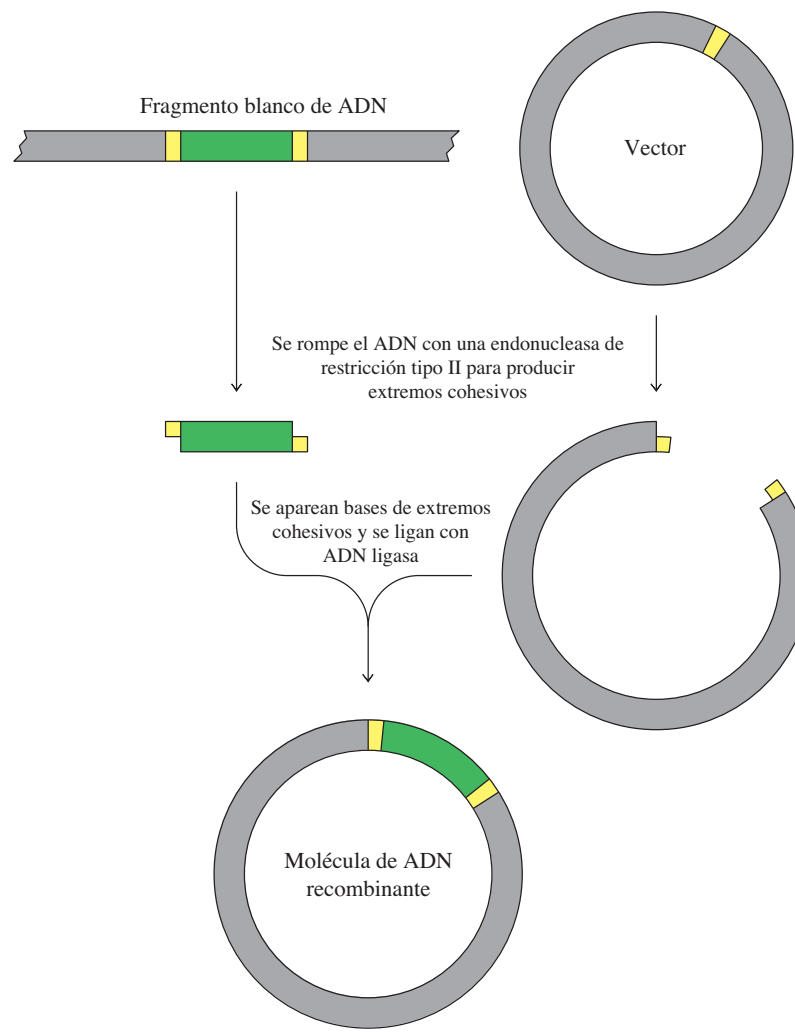


Figura 23.2 ▶
Uso de enzimas de restricción para generar ADN recombinante. El ADN vector y el ADN objetivo se dividen con endonucleasas de restricción para generar extremos que puedan unirse entre sí. En casos donde se producen extremos cohesivos, las dos moléculas se unen por revenido (apareamiento de bases) de los extremos complementarios. A continuación las moléculas se unen en forma covalente entre sí en una reacción catalizada por ADN ligasa. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

das. Si las extensiones de una hebra se eliminan por digestión con una nucleasa específica para una hebra, entonces se crea un nuevo sitio con terminación roma que se puede unir a fragmentos objetivo con extremos romos, como los generados por corte mecánico. La T_4 ADN ligasa cataliza este tipo de ligadura, aunque no es muy eficiente.

También se puede insertar un fragmento de ADN sintético, llamado *ligador*, en un vector que se ha dividido con una endonucleasa de restricción. Ese ligador se puede escoger para que tenga una o más secuencias de reconocimiento adecuadas para la inserción de una molécula de ADN objetivo. Otro método para generar extremos cohesivos, para unir con eficacia fragmentos de ADN, usa la enzima terminal desoxinucleotidiltransferasa para agregar una cola de homopolinucleótido a la cada ADN. Esta enzima añade nucleótidos al extremo OH 3′ del ADN, de preferencia después de generar un tramo corto de una hebra por tratamiento con una exonucleasa específica para 5′. El uso de nucleótidos complementarios (como dTTP para un extremo y dATP para el otro) produce extremos cohesivos. El ADN de inserción se puede producir también por acción de transcriptasa reversa sobre ARNm (sección 23.5).

A. Plásmidos vectores

Los plásmidos son moléculas circulares de ADN relativamente pequeñas. Se usan con frecuencia como vectores para fragmentos de ADN de hasta 20 kb de tamaño. Los plásmidos se pueden replicar en forma autónoma dentro de un huésped, y con frecuencia contienen genes que confieren resistencia a antibióticos como tetraciclina, ampicilina o kanamicina. La expresión de esos genes marcadores puede usarse para diferenciar entre las células anfitrionas que contienen los vectores y las que no los contienen (sección 23.3A).

El pBR322 (figura 23.3) fue uno de los primeros plásmidos vectores que se desarrollaron; es el ancestro de muchos de los plásmidos vectores que se usan en los laboratorios de bioquímica. El pBR322 contiene un origen (*ori*) de replicación y un gen (*rop*) que ayuda a regular la cantidad de copias de ADN plásmido en la célula. Hay dos genes marcadores: amp^R confiere resistencia a la ampicilina y ter^R confiere resistencia a la tetraciclina. (En la sección 23.3 se describirá la utilidad de esos genes.) El pBR322 contiene varios sitios únicos de restricción útiles para formar ADN recombinante. Cualquiera de las enzimas cuyos sitios se ven en la figura 23.3 puede digerir ADN, tanto objetivo como vector. Como esos sitios sólo existen una vez en el ADN vector, se pueden insertar los fragmentos objetivo, y se vuelve a formar una molécula circular después de la ligadura de los extremos cohesivos, como se ve en la figura 23.2.

Hay muchos y diferentes tipos de plásmidos vectores; varían en la cantidad y tipo de sitios de restricción y de marcadores seleccionables. Algunos se han diseñado en forma específica para facilitar la secuenciación rápida del ADN insertado, en tanto que otros contienen fuertes promotores y secuencias de Shine-Dalgarno que maximizan la expresión de los genes insertados. Otros vectores plásmidos se usan para mutagénesis *in vitro* (sección 23.12). La mayor parte de los plásmidos sólo se replican dentro de una célula bacteriana, y dependiendo del *ori*, una sola célula puede contener 1 a 300 o más copias del ADN.

Los plásmidos se suelen introducir a las células bacterianas por transformación. Con eso se limita el tamaño del ADN insertado, porque los plásmidos grandes no son tomados por el anfitrión con facilidad. Se han desarrollado plásmidos modificados en forma específica para dar cabida a segmentos mayores de ADN y se llaman cromosomas bacterianos artificiales (BAC, *bacterial artificial chromosomes*). Su mayor tamaño necesita el uso de electroporación, un pulso de alto voltaje que aumente la permeabilidad celular, para introducir al ADN en las células.

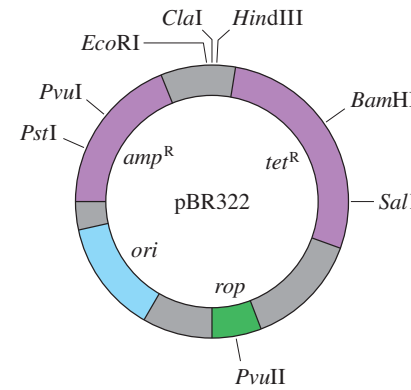


Figura 23.3 ▲
Vector pBR322 de plásmido. Este plásmido es un ADN circular pequeño de 4361 pares de bases. Contiene un origen de replicación (*ori*) y genes que confieren resistencia a los antibióticos ampicilina (amp^R) y tetraciclina (tet^R). El gen *rop* (represor de cebador) regula la replicación del ADN de modo que haya unas 20 copias del plásmido por célula de bacteria. El plásmido también contiene varios sitios únicos de restricción (sólo se ven unos pocos comunes). (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

B. Vectores de bacteriófago λ

El bacteriófago λ es un vector eficiente que se usa con frecuencia para llevar ADN a una célula bacteriana. La ventaja de los vectores fago sobre los plásmidos vectores es que la transfección es mucho más eficaz que la transformación, y permite elaborar bibliotecas de insertos más grandes.

Igual que los plásmidos, hay límites prácticos para el tamaño de los fragmentos de ADN que se pueden clonar usando vectores fago. El bacteriófago λ infeccioso está for-

mado por una cabeza y una cola (ambas formadas por proteínas de fago) y ADN. El ensamble de las partículas de fago a partir de las proteínas de fago y ADN (lo que se llama "empacamiento") requiere secuencias específicas de extremos cohesivos, llamadas sitios *cos*, que están ubicadas en los extremos del ADN lineal del fago. Para estar bien empacado, el ADN debe tener unos 40 a 50 kb de longitud. Si el ADN es muy grande o muy pequeño, no se empaca en las partículas de fago infeccioso (véase adelante). Los vectores mismos se forman modificando el ADN del fago λ de tal modo que se omitan varios genes de fago no esenciales. De acuerdo con el vector, se pueden usar derivados modificados de λ para clonar fragmentos que van desde algunos cientos de pb hasta 22 kb. Las partículas empacadas de fago se introducen en las células huésped por infección.

La figura 23.4 muestra la estrategia general para clonar ADN genómico en el fago λ. El ADN de inserto se prepara digiriendo parcialmente ADN de genoma con una endonucleasa de restricción, como *Eco*RI. La digestión parcial produce trozos de ADN de tamaños variables. Los fragmentos se separan de acuerdo con su tamaño por electroforesis, y se elimina del gel el ADN que tenga 11 a 35 kb de longitud, para la ligación al vector.

El ADN vector se prepara aislando ADN de fago λ y cortándolo con *Eco*RI. El vector de la figura 23.4 se divide en tres fragmentos: dos fragmentos extremos, llamados brazos λ, y un fragmento de disección. Al ligar los brazos de vector con ADN genómico se forman concatémeros largos, que son sustratos para el extracto de empaque *in vitro*. Según se mencionó antes, los sitios *cos* del fago deben estar separados por 40 a 51 kb para que el empaque sea eficaz, lo que quiere decir que un vector diseñado en forma óptima puede albergar a insertos de ADN genómico ajeno que van de 11 a 22 kb de longitud. Las partículas de fago que resultan se pueden usar entonces para infectar *E. coli* y producir placas (zonas de células lisadas), cada una de las cuales procede de un solo fago recombinante.

Unos vectores especiales llamados **cósmidos**, que contienen un *ori* de tipo plásmido, y también un sitio *cos* de fago, combinan las ventajas de los vectores plásmidos y de fago. Los cósmidos no sólo dan cabida a grandes fragmentos de ADN y permiten una transfección eficiente, sino también permiten la propagación de la molécula de ADN recombinante como plásmido, una vez inyectada en la célula huésped.

C. Vectores lanzadera

Algunos tipos de vectores se pueden replicar en células procarióticas y eucarióticas. Se llaman *vectores lanzadera*, porque se pueden usar para transferir moléculas de ADN recombinante entre procariotas y eucariotas. Los vectores lanzadera tienen gran utilidad en el estudio de productos genéticos eucarióticos, porque la clonación y manipulación inicial del gen se pueden hacer en una célula bacteriana, en tanto que la función y la expresión del gen se pueden efectuar en una célula eucariótica. Los vectores lanzadera de levadura contienen genes procarióticos de resistencia a antibióticos, que permiten la selección en anfitriones bacterianos, y genes de levadura para biosíntesis de metabolitos, que permiten la selección en células de levadura (figura 23.5, página 726). Los vectores contienen también orígenes separados de replicación, activos en cada tipo de huésped.

D. Cromosomas artificiales de levadura como vectores

Los fragmentos grandes de ADN también se pueden insertar en cromosomas artificiales que se repliquen en células eucarióticas. Esos cromosomas deben ser lineales y contener un origen eucariótico de replicación, un centrómero, y secuencias especiales en los extremos llamadas telómeros. La figura 23.5 de la página 726 muestra un ejemplo de un cromosoma artificial de levadura (YAC, *yeast artificial chromosome*). Este vector lanzadera contiene ADN centromérico de levadura (*CEN*4) y un origen de replicación en levadura (ARS1). El vector contiene también dos genes marcadores para selección en las células de levadura (*TRP*1 y *URA*3), que codifican proteínas necesarias en las rutas de biosíntesis de triptófano y uracilo, respectivamente, y un gen marcador para seleccionar en *E. coli* (amp^R). (En la sección 23.3 se describen las estrategias de selección).

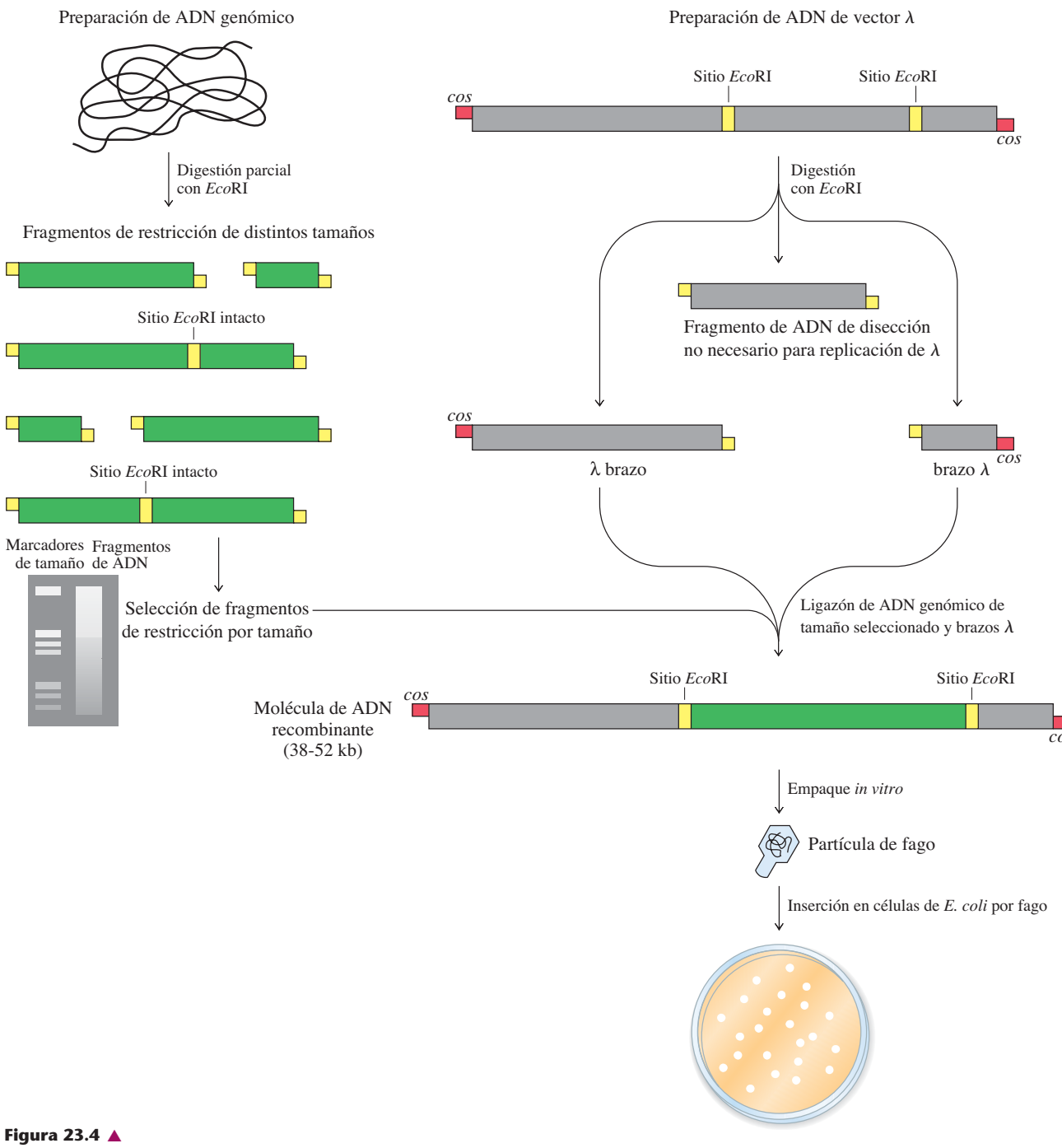


Figura 23.4 ▲
Preparación y uso del vector λ de fago. El ADN del genoma se digiere parcialmente con *Eco*RI (una digestión parcial deja intactos algunos sitios *Eco*RI). Los fragmentos que resultan se separan por electroforesis en un gel de agarosa. (Los fragmentos, que están en la banda derecha, aparecen como una mancha debido al intervalo de sus tamaños). Unas moléculas de ADN de tamaño conocido (marcadores de tamaño) se usan para ubicar en forma adecuada los fragmentos clasificados, que se recuperan del gel y se ligan a los brazos del ADN del vector λ. El ADN del vector λ se prepara digiriéndolo con *Eco*RI, y se obtienen los brazos λ, cada uno de los cuales contiene un sitio *cos* en un extremo. Como los brazos λ se arman en fagos sólo si se ligan para insertar ADN del tamaño correcto, se seleccionan los fagos recombinantes. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

Los YAC se introducen en las células de levadura como moléculas lineales (a diferencia de las células de *E. coli*, las de levadura se transforman eficazmente con ADN lineal). Una vez introducidos a la célula, los YAC se replican al mismo tiempo que los

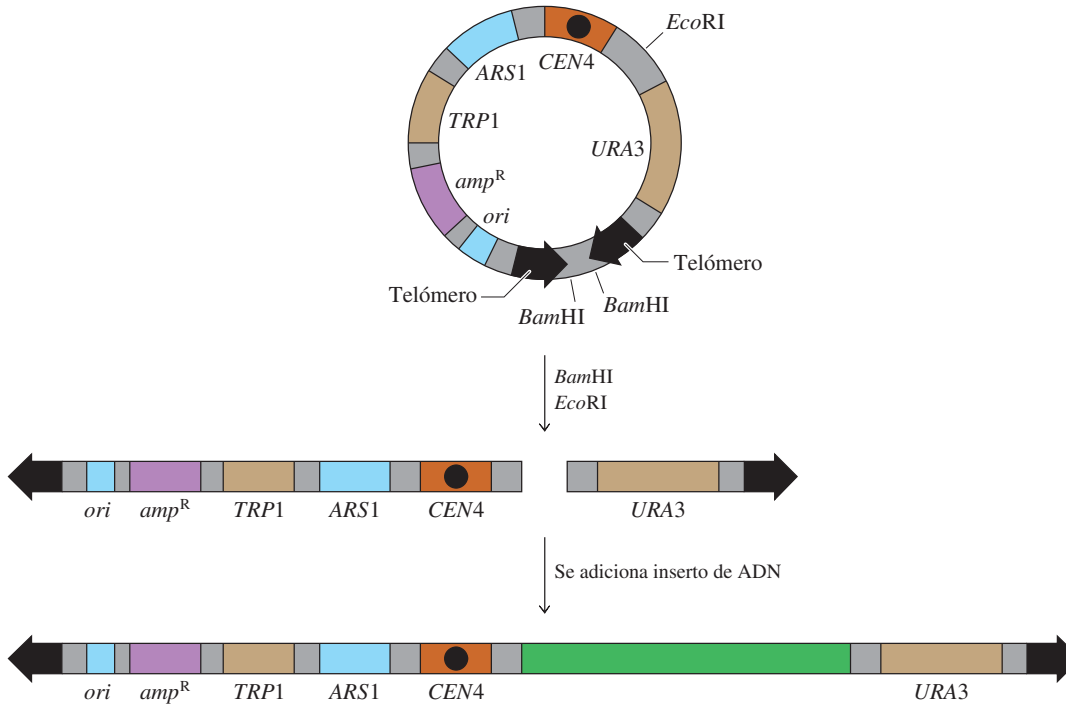
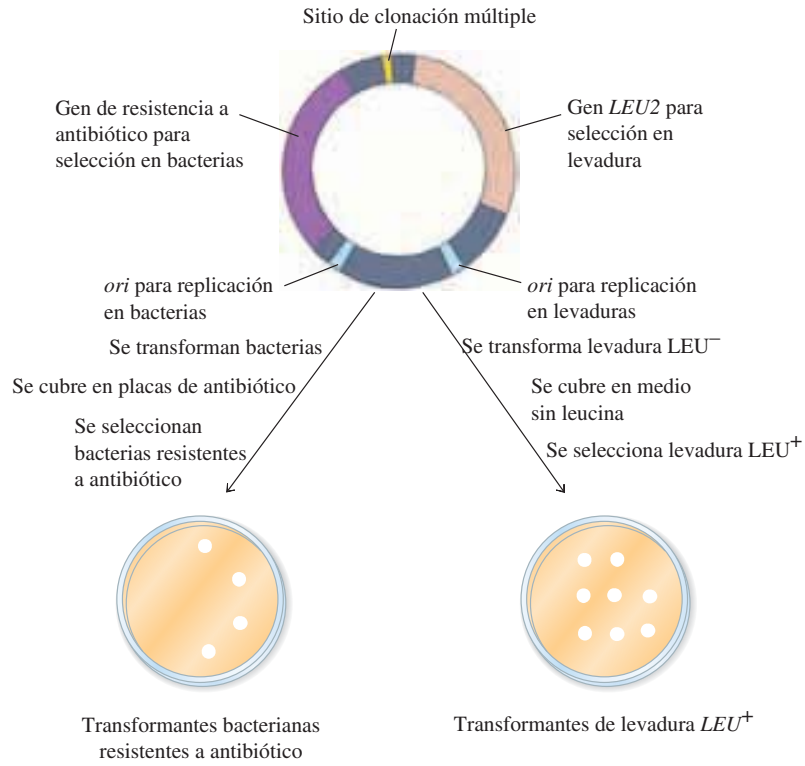


Figura 23.5 ▲
Cromosoma artificial de levadura (YAC). Este vector de lanzadera contiene ADN centromérico de levadura (*CEN*4) y un origen de replicación en levadura (*ARS*1). El plásmido contiene también dos genes marcadores para seleccionar en células de levadura (*TRP*1 y *URA*3) y un gen marcador para selección en *E. coli* (amp^R). Los fragmentos grandes de ADN (400 a 500 kb) se pueden insertar en el sitio *Eco*RI único. Las secuencias teloméricas se ordenan en el plásmido para que al dividirlas con la enzima de restricción *Bam*HI se elimine un fragmento de ADN y quede un vector lineal con extremos teloméricos. Después de una división de la molécula de ADN recombinante por acción de *Bam*HI, el cromosoma artificial lineal se usa para transformar las células de la levadura. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

Figura 23.6 ▶
Vector lanzadera de levadura que se puede propagar y seleccionar tanto en *Escherichia coli* como en *Saccharomyces cerevisiae*. Los recombinantes se seleccionan en *E. coli* por su capacidad de crecer en presencia de antibiótico, y en cepas deficientes en *LEU2* por la capacidad de crecer en ausencia de leucina exógena. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).



cromosomas de levadura endógenos, y segregan en la mitosis, igual como hacen los demás cromosomas (algunos cromosomas de levadura tienen más o menos el mismo tamaño que los YAC).

23.3 Identificación de células anfitrión que contienen ADN recombinante

Una vez que se han unido *in vitro* un vector de clonación y un ADN de inserto, la molécula de ADN recombinante se puede introducir a una célula anfitriona, con mayor frecuencia en una célula bacteriana como *E. coli*. En general, la transformación no es una forma muy eficiente de que el ADN entre a una célula, porque sólo un pequeño porcentaje de las células toman ADN recombinante. En consecuencia, las células que se han transformado de manera correcta deben diferenciarse de la vasta mayoría de células no transformadas. La identificación de células anfitrionas que contienen ADN recombinante requiere una selección genética, una clasificación, o ambas cosas.

En una *selección,* las células crecen en condiciones en las que sólo pueden sobrevivir las células que se van a transferir; todas las demás células mueren. En contraste, en una *clasificación* o *selección*, las células transformadas deben analizarse de manera individual para ver la presencia del ADN recombinante que se desea. Por lo regular se seleccionan primero varias colonias de células, y después se clasifican por colonias que contienen el inserto que se desea.

A. En las estrategias de selección se usan genes marcadores

Muchas estrategias de selección usan genes marcadores seleccionables, genes cuya presencia se puede detectar y demostrar con facilidad. Por ejemplo, muchos vectores plásmidos bacterianos contienen un gen marcador que codifica β-lactamasa, que cataliza la hidrólisis de antibióticos de β-lactama, como ampicilina. Sólo las células transformadas con plásmidos que contengan y expresen el gen β-lactamasa pueden crecer en medios que contienen ampicilina. Esas células son resistentes a ampicilina (amp^R). Las bacterias que no han tomado al plásmido mueren cuando se colocan en medios que contienen ampicilina o se frotan sobre agar que contiene el antibiótico. Este método de selección elimina con eficacia las grandes cantidades de células que no absorbieron ADN durante el paso de transformación.

La selección también se puede efectuar mediante **inactivación de inserción**. Con esa técnica, la inserción de un fragmento de ADN dentro de la región codificadora de un gen funcional en un vector causa la inactivación de ese gen. Si el gen codifica un producto que se detecta con facilidad, se puede usar la inactivación por inserción para seleccionar y clasificar. Por ejemplo, el plásmido pBR322 (figura 23.3) contiene dos genes que confieren resistencia a antibióticos: uno para ampicilina (amp^R) y otro para tetraciclina (tet^R). Hay varios sitios de clonación que se suelen usar con el gen tet^R. La inserción de ADN en uno de esos sitios inactiva al gen tet^R y provoca transformados que son sensibles a la tetraciclina (tet^S) pero resistentes a ampicilina (amp^R). Las células transformadas por plásmidos que no contienen el inserto son células $amp^R tet^R$; las que no tienen plásmido alguno son $amp^S tet^S$.

B. Selección en eucariotas

Algunos de los vectores plásmidos que crecen en levaduras llevan el gen *LEU*2 de levadura, que codifica la enzima β-isopropilato deshidrogenasa, enzima esencial en la ruta de biosíntesis de leucina. Las células transformadas con un plásmido que contenga *LEU*2 pueden crecer en un medio sin leucina. Muchos otros genes marcadores de levaduras se usan con frecuencia para selección.

C. Marcadores visuales: inactivación por inserción del gen de β-galactosidasa

También se pueden usar marcadores visuales para la selección de células huésped que contengan moléculas de ADN recombinante. Por ejemplo, el gen *lac*Z de *E. coli* codifi-

La genética del operón *lac* de *E. coli* se describe en la sección 21.7.

Figura 23.7 ▲
Pantalla azul/blanca. X-gal es un sustrato cromogénico dividido por β-galactosidasa para formar un tinte azul. Las colonias azules representan células transformadas con vectores clonantes que no contienen insertos. En estas células, la β-galactosidasa es activa. Las colonias blancas representan células transformadas con recombinantes. En esas células se ha alterado el gen de β-galactosidasa por el inserto. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

ca la enzima β-galactosidasa, que cataliza la hidrólisis del sustrato sintético 5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-galactosidasina (que se conoce con frecuencia como X-gal). La división de X-gal produce el colorante azul 5-bromo-4-cloroindol. La presencia de colorante azul identifica a las células que contienen β-galactosidasa activa. En ausencia de la enzima, la X-gal no se divide y no se observa color azul.

Muchos vectores plásmidos de clonación llevan el gen *lac*Z o una versión modificada que también produce actividad de β-galactosidasa. Dentro del gen *lac*Z hay muchos sitios de restricción donde se puede insertar ADN ajeno. Los vectores sin insertos producen β-galactosidasa funcional, y por consiguiente forman colonias azules en presencia de X-gal. Cuando se inserta ADN en uno de los sitios de restricción, el gen *lac*Z se interrumpe y los recombinantes que resultan no producen β-galactosidasa funcional. Así, las colonias que contienen ADN recombinante son blancas (figura 23.7). Esta técnica de clasificación es muy poderosa, porque con frecuencia se puede distinguir una sola colonia blanca entre unas 10^4 azules.

23.4 Bibliotecas genómicas

Se ha visto que la tecnología de ADN recombinante tiene excepcional utilidad para aislar grandes cantidades de fragmentos específicos de ADN en organismos con genomas complejos. El proceso de clonar esos fragmentos suele comenzar con la preparación de una biblioteca de ADN. Una **biblioteca de ADN** no es más que una colección de moléculas de ADN recombinante generadas ligando todos los fragmentos de determinada muestra de ADN, del ADN a un vector. Las moléculas de ADN recombinante se introducen entonces a células, donde se replica cada recombinante. La clase de biblioteca de ADN obtenida depende de la naturaleza del inserto, el tipo de vector usado y la clase de problema científico por investigar.

RECUADRO 23.1 El Proyecto Genoma Humano

El Proyecto Genoma Humano es una investigación internacional cuya meta principal es secuenciar y analizar todo el genoma humano. En el proyecto intervienen cientos de científicos de más de una docena de países. El genoma humano contiene unos 3.2 millones de pares de bases en 22 autosomas, más el par de cromosomas sexuales. El primer "borrador" de la secuencia fue anunciado en forma simultánea en varios países en junio de 2000. Al mismo tiempo, una empresa privada de tecnología declaró que había secuenciado el genoma humano en forma independiente.

En el esfuerzo internacional se usó una gran variedad de estrategias y distintas tecnologías. Al principio el enfoque fue en la creación de un mapa genético detallado de todos los cromosomas. Este mapa se usó para ordenar fragmentos de ADN y ubicarlos en cromosomas específicos. A este paso inicial siguió la construcción de bibliotecas genómicas usando vectores que contenían grandes insertos (por ejemplo, vectores BAC). Por último, una actividad intensa de secuenciación llevó al borrador de la secuencia.

Muchos laboratorios trabajaron juntos en determinados cromosomas, y las actividades de análisis de secuencias fueron de la mano con las actividades de secuenciación. El análisis incluye la identificación de genes y su función. Esta parte del esfuerzo se llamó *anotación*. La estrategia del cromosoma único llevó a la publicación de secuencias anotadas de los cromosomas 22 y 21 en 1999 y 2000, respectivamente.

Gran parte del trabajo está por hacer. Se debe anotar el borrador de toda la secuencia, lo que tardará muchos años. Los resultados iniciales, publicados en febrero de 2001, parecen indicar que el genoma humano contiene 20 000 a 40 000 genes diferentes. Se debe notar que no está completa la secuencia del genoma humano. El borrador contiene 85% del genoma. Casi cada cromosoma contiene huecos en la secuencia, que corresponden a regiones de ADN muy repetitivo. Estas regiones no se pueden clonar y propagar en vectores normales de ADN recombinante.

Aunque es un hito en la investigación genética, la secuenciación del genoma humano no equivale a un influjo instantáneo de nuevas formas para prevenir, diagnosticar y curar las enfermedades. Sin embargo, a la larga, al conocer la secuencia del genoma humano se ayudará mucho a aliviar o curar muchas de las 5 000 enfermedades hereditarias estimadas, y muchas de las demás condiciones donde la predicción genética tiene una función. En forma específica, los resultados de esta investigación deben permitir la evaluación individual de riesgo, diagnóstico preciso de enfermedades, predicción del curso de una enfermedad y mayor diseño de tratamientos. En reconocimiento a las múltiples implicaciones sociales y éticas de esas posibilidades, el Proyecto Genoma Humano ha asignado 3% de su presupuesto a asuntos éticos.

Las bibliotecas genómicas, que representan todo el ADN del genoma de un organismo, usan con frecuencia vectores de clonación derivados de bacteriófagos. Con frecuencia se usa restricción parcial, y no total, para asegurar que la biblioteca contenga cada gen (figura 23.4). Los vectores cósmidos YAC y BAC se usan también en forma sistemática para formar bibliotecas genómicas, en especial si el genoma es muy grande. Los vectores YAC pueden dar cabida a insertos de unos 500 kb, lo que quiere decir que para muchas especies eucarióticas se necesita una biblioteca de 10 000 YAC diferentes para contener al genoma. Las bibliotecas de BAC han tenido un papel importante en el Proyecto Genoma Humano. Una biblioteca BAC del genoma humano consiste en unos 20 000 clones BAC diferentes, que contienen un total de 3 000 millones de pares de bases. Cada recombinante contiene un fragmento de genoma humano de 150 a 200 kb. Nótese que una biblioteca genómica incluye ADN del organismo, tanto expresado como no expresado. En los eucariotas con genomas grandes y complejos, el ADN no codificante forma muchos fragmentos de la biblioteca.

23.5 Preparación de bibliotecas de ADNc a partir de ARNm

Además de las bibliotecas genómicas, es posible formar bibliotecas de ADN recombinante que representen todos los ARN formados en determinado tipo de célula o tejido. Se llaman **bibliotecas de ADNc**. El ADNc (ADN complementario) es ADN de doble hebra obtenido con transcriptasa reversa, la enzima que sintetiza ADN usando una plantilla de ARNm.

La creación de una biblioteca de ADNc empieza con la purificación de ARNm. La mayor parte de las técnicas para purificar moléculas de ARNm de eucariotas aprovechan las colas de poli A presentes en el ARNm eucariótico maduro (sección 21.9A). Eso permite separar el ARNm eucariótico de las moléculas de ARNr y ARNt, más abundantes, que carecen de colas de poli A. El ARNm que contiene poli A (3% del ARN total) se une en forma selectiva a oligodesoxitimidilato (oligo dT) unido en forma covalente a una matriz insoluble, como celulosa.

La síntesis de ADNc de doble hebra se ilustra en la figura 23.8 de la página siguiente. En el primer paso, la población de ARNm se incuba con oligo dT, que se hibrida con la secuencia de poli A en el extremo 3′ de cada molécula de ARNm. El fragmento con oligo dT funciona como cebador para la síntesis de una hebra complementaria de ADN por transcriptasa reversa. El híbrido de ARNm-ADNc resultante se trata después con RNasa H, enzima que hace muescas en el ARN dejando pequeños fragmentos apareados por sus bases con la hebra de ADN. Esos fragmentos se usan como cebadores por la ADN polimerasa I, que degrada los fragmentos de ARN debido a su actividad de exonucleasa $5' \rightarrow 3'$ y sustituye el ARN con una hebra continua de ADN al avanzar por la plantilla (reacción análoga a la unión de fragmentos de Okazaki durante la replicación del ADN; sección 20.3C). El producto de estas reacciones es una molécula de ADNdc de doble hebra, cuya secuencia corresponde a la del ARNm original. Las moléculas de ADNc se convierten con frecuencia en moléculas de ADNc con extremos cohesivos, agregando oligonucleótidos sintéticos. La construcción de una biblioteca de ADNc se completa ligando las moléculas de ADNc con vectores, e introduciendo los recombinantes en las células huésped (que suelen ser *E. coli*).

Una biblioteca de ADNc aprovecha que distintas poblaciones de moléculas de ARNm se encuentren en distintos tipos de células. Aunque las moléculas de ADN genómicas son idénticas en casi todas las células de un organismo, las poblaciones de ARNm difieren de acuerdo con las funciones especializadas de cada tipo celular. Así, mientras que las células hepáticas y cerebrales contienen muchas moléculas de ARNm idénticas derivadas de genes domésticos, cada tipo celular contiene también moléculas de ARNm que codifican componentes necesarios para las funciones especializadas. La construcción de una biblioteca de ADNc a partir de tejidos específicos donde la proteína objetivo es abundante aumenta las probabilidades de clonar bien el gen de interés. Por ejemplo, los ADNc de globina son abundantes en una biblioteca preparada con ARNm aislado de glóbulos rojos. Nótese que es imposible clonar el gen para una proteína que no se expresa en el tejido de donde se derivó la biblioteca de ADNc.

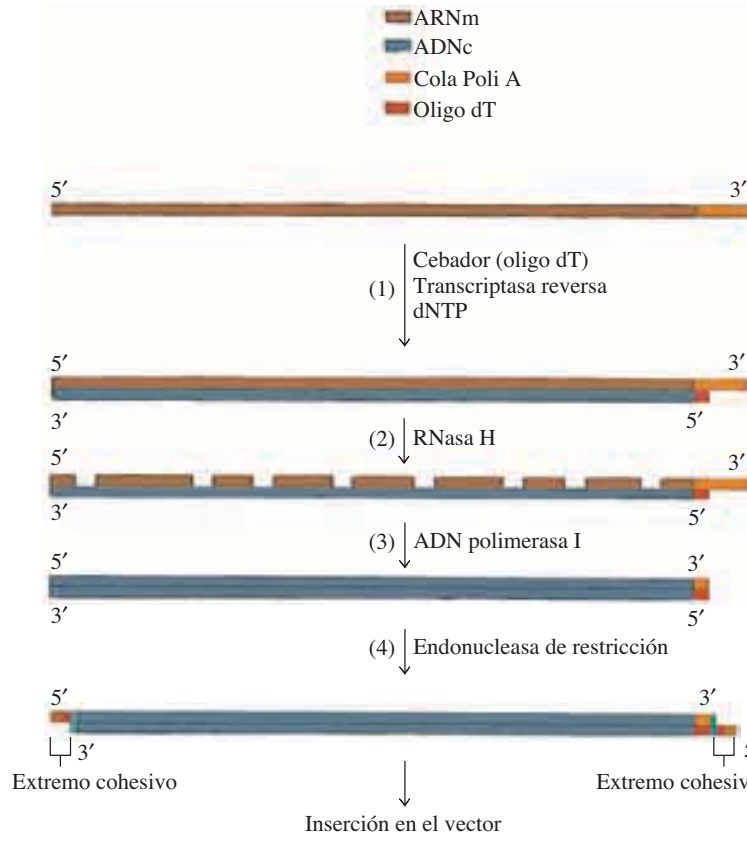


Figura 23.8 ▶
Preparación de ADNc. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

En la preparación de bibliotecas de ADNc se usan vectores λ de fago especializado y de plásmidos. Estas bibliotecas deberían representar a todos los genes expresados en determinada célula o tejido en un momento en particular durante el desarrollo. Además, como las bibliotecas de ADNc se derivan de ARNm maduro y no de transcritos primarios de ARN o de los genes mismos, no incluyen intrones ni secuencias de flanqueo, y en consecuencia son mucho menos complejas que las bibliotecas genómicas. Las bibliotecas de ADNc de alta calidad contienen numerosos clones recombinantes, y el tamaño promedio del inserto de ADNc es grande. Deben estar bien representadas las moléculas de ARNm, tanto raras como abundantes. Es claro que la calidad de la biblioteca depende de la calidad del ARNm usado en el arranque, su tamaño y su pureza, y de la eficiencia acumulada de los pasos que se resumen en la figura 23.8. Por estas razones, las bibliotecas de ADNc que representan moléculas de ARNm de abundancia escasa y grande son mucho más difíciles de formar que las bibliotecas de ADN genómico.

23.6 Selección de una biblioteca

El paso más tardado y difícil de la clonación es, con frecuencia, el aislamiento del ADN recombinante deseado entre los muchos y distintos recombinantes presentes en una biblioteca típica. La probabilidad de que una biblioteca de determinado tamaño contenga un clon en particular se calcula con la fórmula

$$P = 1 - (1 - n)^N \quad \text{o} \quad N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - n)} \qquad \textbf{(23.1)}$$

donde N es la cantidad de clones recombinantes en la biblioteca, P es la probabilidad de encontrar determinado clon y n es la frecuencia de ocurrencia del clon deseado. En

general, se supone que todos los fragmentos de ADN se han insertado en vectores y propagado con igual eficiencia. La frecuencia de ocurrencia, *n*, depende del tipo de biblioteca. En una biblioteca de ADN genómico, todos los fragmentos de ADN generados del genoma deben tener igual probabilidad de ligarse a un vector, y en consecuencia de estar presentes en la biblioteca. Así, en una biblioteca de ADN, *n* es la relación del tamaño del inserto entre el tamaño del genoma. Por ejemplo, para tener 99% de certeza de que determinada secuencia del genoma humano (tamaño del genoma 3.2×10^9 pb) esté presente en una biblioteca genómica de 20 kb de tamaño de inserto, se debe estar seguro de que la biblioteca contenga unos 8×10^5 clones recombinantes. (Se necesitan menos clones recombinantes en una biblioteca YAC, donde el tamaño del inserto puede llegar hasta 500 kb.)

Sin embargo, en una biblioteca de ADNc, la probabilidad de encontrar el clon deseado depende de la abundancia de la molécula de ARNm original, y no del tamaño del genoma. En este caso, en una biblioteca de ADNc, *n* es la abundancia de la molécula relevante de ARNm. En un caso típico, las moléculas de abundancia moderada y grande (presentes en 20 a 1 000 copias por célula) forman la mayor parte de la masa de las aproximadamente 2×10^5 moléculas de ARNm por célula. Las moléculas raras (<20 copias por célula, y con frecuencia hasta 0.001% de ARNm con poli A) forman la mayor parte de las diversas especies de ARNm. Así, para tener 99% de certeza de que una biblioteca de ADNc contenga un clon de determinada molécula de ARNm que represente 0.001% del ARNm total, se debe estar seguro de que la biblioteca contenga aproximadamente 5×10^5 clones recombinantes.

En general, los métodos para seleccionar o "sondear" bibliotecas de ADN para ver si tienen el recombinante deseado deben permitir analizar al mismo tiempo miles de recombinantes. Una "sonda" es una molécula que reconoce en forma específica la sección deseada de ADN en una biblioteca grande. La naturaleza de la información disponible determina la clase de sonda que se use y el método de selección. Hay varios tipos diferentes de sondas, y se han desarrollado métodos de clasificación que pueden detectar secuencias de ácidos nucleicos clonados en forma directa (uniéndose al ADN del clon) o en forma indirecta (detectando la presencia del gen producto del ADN clonado). Por ejemplo, un ADNc recombinante de globina se puede identificar con anticuerpos que se unan a hemoglobina. Una vez identificada, la globina ADNc se puede usar como sonda para determinar el gen de globina en una biblioteca genómica.

Se suele usar el mismo procedimiento general cuando se clasifica una biblioteca con una sonda (figura 23.9, página siguiente). Las células que contienen la biblioteca clonada se cultivan en placas de Petri para formar colonias individuales separadas. Los ácidos nucleicos o las proteínas de las células se liberan y transfieren a un filtro, donde se inmovilizan. A continuación el filtro se expone a la sonda, que se marca para poder detectarla. (Las marcas comunes son isótopos radiactivos, colorantes fluorescentes y enzimas cuya actividad produce sustancias coloreadas, cuando se les proporciona el sustrato adecuado.) Después de haber eliminado el exceso de sonda no enlazada por lavado, se detecta el lugar del sensor, unido en forma específica, por la técnica adecuada para la marca (como autorradiografía con las sondas radiactivas). El lugar de la sonda unida en el filtro corresponde al lugar de la colonia que contiene la sonda en la caja de Petri. Ya que ninguna técnica está 100% exenta de errores, la selección se suele hacer con filtros por duplicado, para permitir que los positivos reales (los presentes en los dos filtros) se diferencien de los falsos positivos (los que sólo están en un filtro).

En ciertos casos, el ARN transcrito de un gen puede ser tan abundante y se puede purificar con tal facilidad, que se puede marcar y usar para cribar una biblioteca en forma directa. Algunos de los primeros genes eucarióticos que se aislaron (los de globina, ovoalbúmina y proteínas de choque térmico, por ejemplo) se detectaron de esta manera. Desafortunadamente, esta técnica no funciona con muchos genes codificantes de proteína, aunque se usa de rutina para aislar genes de ARNt y ARNr.

El ADNc clonado se usa con más frecuencia que el ARNm como sonda para genes codificantes de proteína en bibliotecas de ADN genómico. Es más fácil purificar determinada molécula de ADNc usando tecnología de ADN recombinante, que purificar determinada molécula de ARNm de una célula, siempre que se disponga de alguna información sobre la secuencia de la proteína. En esos casos es posible sintetizar una son-

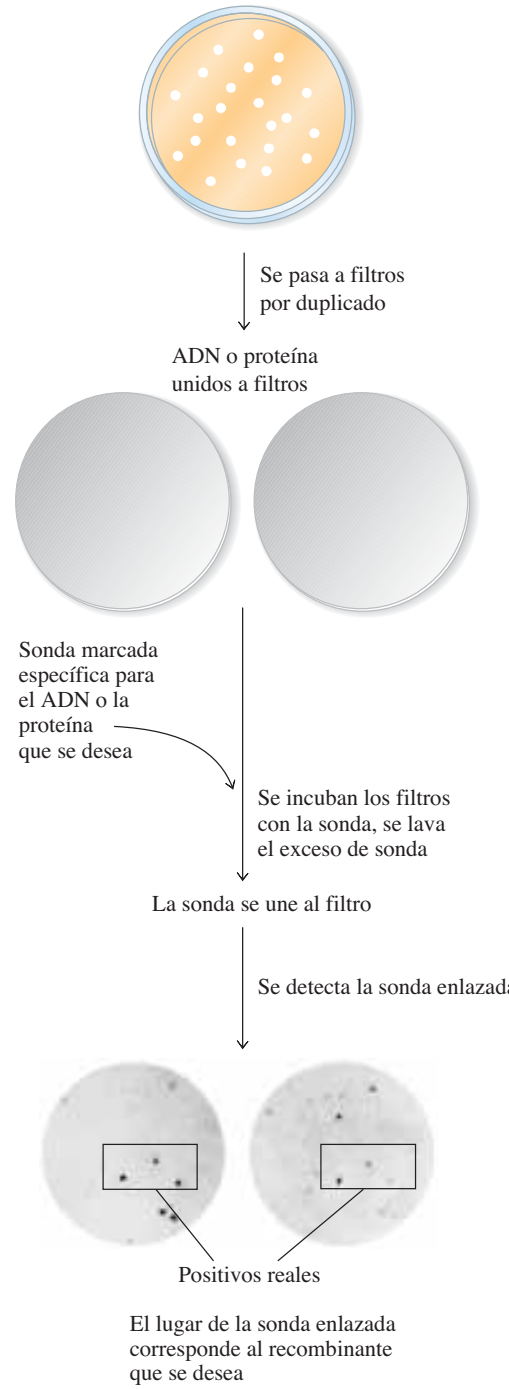


Figura 23.9 ▶
Procedimiento general para clasificar una biblioteca de ADN con una sonda. Las colonias de células que contienen moléculas recombinantes se cultivan en cajas de Petri. Se prepara una réplica de las colonias sobreponiendo un disco de filtro en la caja. El ADN y la proteína se separan de las células *in situ* y se inmovilizan al filtro. Entonces se incuba el filtro con la sonda marcada, bajo condiciones en que la sonda reconozca en forma específica al ADN o a la proteína que se desea. Después de que se lava y separa la sonda unida en forma no específica, la sonda unida en forma específica se detecta con un método adecuado para la marca (en este caso, autorradiografía). Se usan filtros por duplicado para diferenciar positivos falsos de reales. Alineando los filtros con las placas originales se pueden identificar las células que contienen el recombinante de interés.

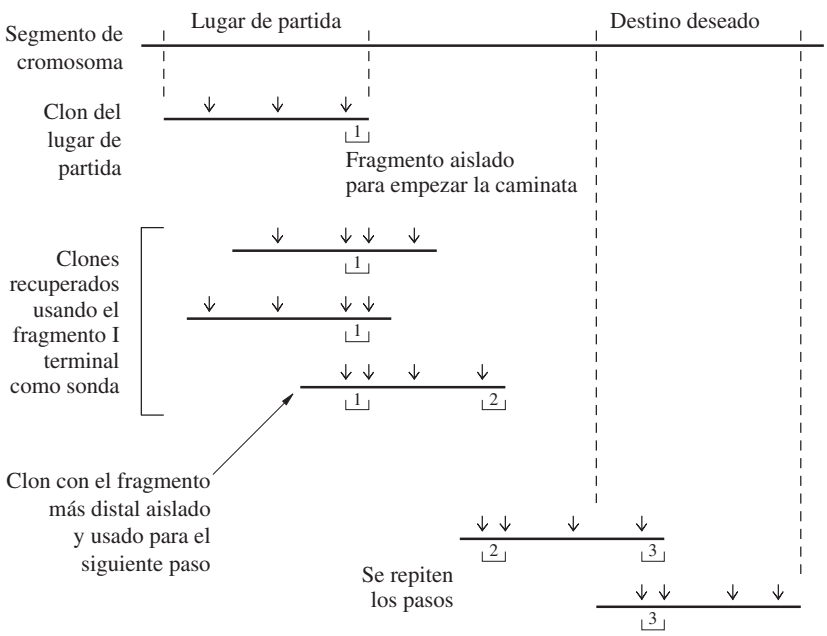
da de oligonucleótido cuya secuencia corresponda a la secuencia esperada por parte del ARNm. Los clones de ADNc de una especie se pueden usar con frecuencia para aislar el gen correspondiente del genoma de otra especie. En esos casos, las secuencias de ADN sólo necesitan tener 60 a 70% de semejanza, ya que las condiciones de hibridamiento (concentración salina y temperatura) se pueden alterar para permitir la formación de ADN híbridos que contengan algunos pares mal apareados de bases (a eso se le llama alterar lo estricto del hibridamiento). Para genes muy conservados, como los de las histonas, las secuencias conservadas permiten hibridamiento aun entre especies relacionadas en forma distante.

23.7 Desplazamiento de cromosomas

A veces es imposible aislar un gen de una biblioteca genómica con técnicas como las descritas en la sección anterior. Por ejemplo, puede ser que un gen sólo se conozca por el efecto de una mutación, y que todavía no se haya identificado su producto. Muchos de los genes responsables de padecimientos heredados en los humanos caen en esta categoría. En tales casos, se usa un fragmento de ADN recombinante de una región cercana en el cromosoma, como punto de partida para un **desplazamiento sobre el cromosoma** hasta el gen objetivo. En esta técnica se aíslan fragmentos superpuestos de ADN en selecciones sucesivas de la biblioteca. En cada paso se clonan regiones cada vez mayores del ADN, lo que permite que los investigadores "se desplacen" a lo largo del cromosoma.

En la figura 23.10 se ve un ejemplo de desplazamiento del cromosoma. El desplazamiento comienza con el aislamiento de un fragmento de ADN que representa el término del recombinante de partida. Este fragmento terminal se marca y se usa para sondear una biblioteca genómica, donde identifica a todos los recombinantes que contengan ese fragmento. El ADN purificado de cada uno de esos recombinantes individuales se divide entonces con endonucleasas de restricción y se "mapea" (se hace un diagrama de localizaciones) (sección 19.7) para identificar el que se extienda más lejos a la región adyacente al clon recombinante inicial. El fragmento terminal del recombinante recién aislado se usa entonces como sonda para el segundo paso del desplazamiento. Este proceso se continúa hasta que el desplazamiento llegue al destino que se desee.

Muchos de los genes que regulan el desarrollo en *Drosophila melanogaster* se aislaron originalmente con desplazamientos sobre el cromosoma. Esos genes se han usado después como sondas para aislar genes homólogos de otros animales. Los investigadores de *Drosophila* usaron también el desplazamiento del cromosoma para aislar genes muy grandes (> 50 kb). Esos genes están interrumpidos con frecuencia por intrones tan grandes que, cuando se clasifica una biblioteca genómica con una sonda de ARNm o ADNc, se identifican dos o más recombinantes, cada uno con secuencias complementarias, pero ninguno contiguo en el cromosoma, o que incluya al gen completo. El desplazamiento sobre el cromosoma permite enlazar esos recombinantes no contiguos y establecer así la estructura completa del gen. Se usó una estrategia similar para identificar los genes humanos, muy grandes, de la fibrosis quística y la distrofia muscular.



◀Figura 23.10
Desplazamiento de cromosomas. Los sitios de endonucleasa de restricción (indicados por flechas verticales) se ubican en el recombinante inicial. Con base en este mapa, el fragmento terminal (1) del recombinante de partida se aísla y se usa para detectar una biblioteca genómica. Los recombinantes que hibridan a este fragmento se ubican por restricción para identificar al recombinante que se extiende más lejos a la región del cromosoma adyacente al primer recombinante. A continuación se repite el proceso usando el fragmento de restricción más alejado del recombinante de inicio, como siguiente sonda.

23.8 Expresión de proteínas mediante tecnología de ADN recombinante

El ADN clonado o amplificado se puede purificar y secuenciar, y se utiliza para producir ARN y proteína, o introducirlo en organismos con objeto de cambiar su fenotipo. Una de las razones por las que la tecnología de ADN recombinante ha tenido un impacto tan grande en bioquímica es que ha superado muchas de las dificultades inherentes en la purificación de proteínas poco abundantes, y en determinar sus secuencias de aminoácidos. Muchas proteínas se descubrieron como bandas en geles de poliacrilamida, o como antígenos que reconocen anticuerpos. Con frecuencia, nada se sabe acerca de la estructura ni la función de la proteína recién descubierta. La tecnología de ADN recombinante permite purificar la proteína sin caracterización posterior. La purificación comienza con la sobreproducción de la proteína en una célula que contenga un vector de expresión.

A. Vectores de expresión procarióticos

Algunos genes eucarióticos en los vectores para clonación pueden expresarse en forma fortuita en los procariotas, pero eso es raro. La mayor parte de los productos genéticos eucarióticos no se pueden detectar en los procariotas, a menos que se produzcan con vectores de expresión especializados. Los **vectores de expresión** para huéspedes bacterianos son en general plásmidos que se han modificado para que contengan las secuencias reguladoras adecuadas para transcripción y traducción, como promotores fuertes, sitios de unión con ribosoma y terminadores de transcripción. Como la distancia entre el sitio de unión con ribosoma y el codón de inicio es crítica (sección 22.5B), muchos vectores contienen sitios de clonación adelante del codón de inicio. Cuando se usan esos vectores, la proteína de interés se genera con alto rendimiento, pero con unos pocos residuos adicionales en el N-término. Los aminoácidos adicionales en general no presentan problema alguno durante los estudios bioquímicos posteriores.

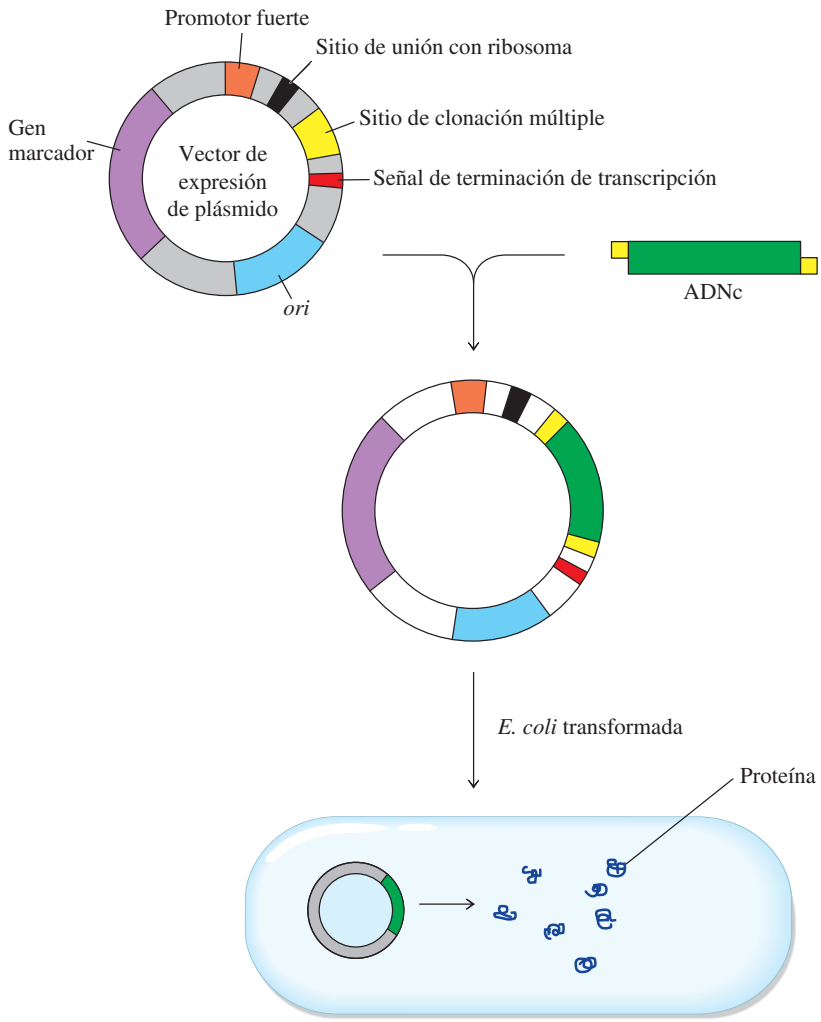
Se pueden preparar proteínas eucarióticas en bacterias si se inserta un fragmento de ADNc en un vector de expresión (figura 23.11). Se pueden purificar grandes cantidades de una proteína que se desee a partir de las células transformadas. En algunos casos, se pueden usar las proteínas para tratar pacientes con afecciones genéticas. Por ejemplo, se han producido la hormona de crecimiento humano, la insulina y varios factores de coagulación de la sangre usando tecnología de ADN recombinante y vectores de expresión.

Los genes antes desconocidos se pueden identificar si se preparan sus productos en las bacterias. Con anticuerpos que reconocen una proteína se pueden seleccionar clones de bibliotecas de ADNc de vector de expresión. Este método tiene utilidad especial para proteínas en una etapa temprana de caracterización, ya que no se necesita conocer más acerca de la proteína, que la posición de su banda en un gel de poliacrilamida. La banda se puede separar para inyectar la proteína en un animal y crear anticuerpos para la selección. Los anticuerpos se pueden marcar y usar como sondas para identificar las células recombinantes que expresan el antígeno proteico deseado.

B. Expresión de proteínas en eucariotas

Las células procarióticas pueden no ser capaces de producir proteínas funcionales a partir de genes eucarióticos, aun cuando estén presentes todas las señales necesarias para la expresión genética, porque muchas proteínas eucarióticas se deben modificar después de la traducción (por ejemplo, por glicosilación). Las células de *Escherichia coli* carecen de algunas de las enzimas necesarias para catalizar esas modificaciones. Se han desarrollado varios vectores de expresión que funcionan en eucariotas. Esos vectores contienen orígenes eucarióticos de replicación, genes marcadores para selección en eucariotas, regiones de transcripción y traducción, y propiedades adicionales necesarias para la traducción eficiente de ARNm eucariótico, como señales de poliadenilación y sitios de encasquetado (sección 21.9A).

Las levaduras y otras células eucarióticas en cultivos son anfitriones adecuados para clonar genes eucarióticos. Esas células tienen las enzimas necesarias para cortar y empalmar transcritos primarios de ARN para producir moléculas maduras de ARNm. Por esta razón, los genes eucarióticos con intrones se pueden aislar de las bibliotecas genómicas, para expresarlos en forma directa en esas células.



◀Figura 23.11
Expresión de una proteína eucariótica en *E. coli*. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

También es posible crear moléculas de ADN recombinante que se puedan integrar a los genomas de grandes organismos multicelulares, incluso los mamíferos. Esos recombinantes contienen con frecuencia un gen bajo el control de un promotor que es activo en el organismo anfitrión. Si se transforma un zigoto o un embrión temprano, puede crecer y formar un organismo que lleva el ADN recombinante en algunas de sus células. Mediante cruzamiento posterior se puede obtener un individuo que contenga ADN en todas sus células. Esos individuos se llaman **organismos transgénicos**, porque tienen ADN ajeno integrado en forma estable. La figura 23.12 de la página siguiente ilustra una técnica para crear un ratón transgénico que lleva un gen ajeno. Mediante esta tecnología se han creado ratones transgénicos que contienen el gen de la hormona de crecimiento en las ratas (figura 23.13, página siguiente).

23.9 Aplicaciones de la tecnología de ADN recombinante

Las aplicaciones de la biotecnología de ácidos nucleicos van desde la investigación básica hasta la terapia genética. Para describir esas aplicaciones es importante diferenciar entre cambios somáticos en el tejido de un individuo específico, que no pasan a generaciones siguientes, y cambios hechos al genoma, donde las células germinales se alteran genéticamente, y entonces los cambios pueden pasar a la descendencia.

Figura 23.12 ▶
Técnica para crear un ratón transgénico.

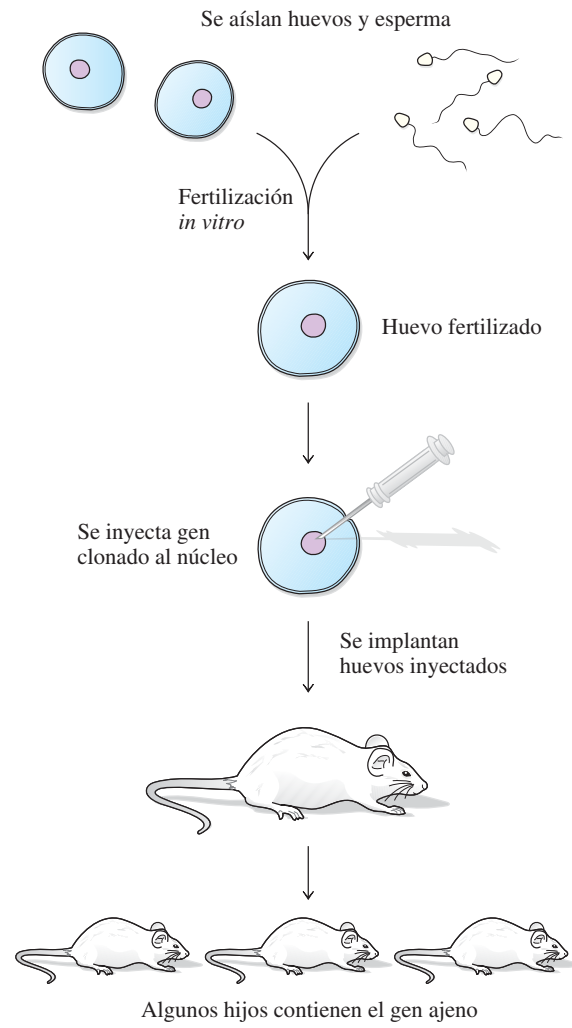
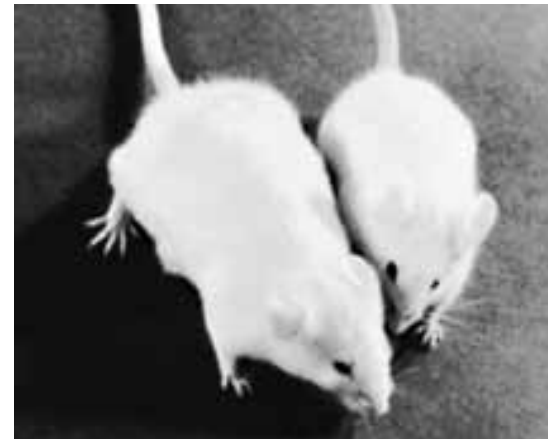


Figura 23.13 ▶
Efecto de un gen adicional de hormona de crecimiento en ratones. Los dos ratones son hermanos. El ratón de la izquierda es transgénico y lleva un gen hormona de crecimiento de ratón. El ratón de la derecha es normal.



La ingeniería genética tiene una actividad especial en el campo agrícola, donde la alteración de los genes ha producido plantas con mayores rendimientos, alterando características de maduración o de resistencia a insectos, enfermedades o heladas. Otra área de investigación es la incorporación de capacidad fijadora de nitrógeno en plantas que carecen de ella.

Otro ejemplo importante son los experimentos descritos en la sección 23.8, con objeto de alterar la composición genética de ratones (u otros animales de laboratorio). Los animales transgénicos que se alteraron con cuidado pueden suministrar ratones modelo que permitan la investigación cuya finalidad es combatir enfermedades humanas. Manipulaciones genéticas como esas también pueden ayudar a determinar las diferencias entre las células o tejidos normales y enfermos, y llevarían a comprender qué es lo que causa la enfermedad.

Las técnicas perfeccionadas sólo en la última década están ampliando el estudio de los microbios. No sólo se permite así comprender la bioquímica de esos organismos, sino también se contribuye a manejar las infecciones al comprender la genética de la virulencia microbiana.

A. Ingeniería genética de plantas

Se han cultivado las plantas durante milenios para aumentar las características favorables en cultivos alimenticios importantes. Sin embargo, el gran tamaño de los genomas vegetales, y ciertos problemas técnicos, han estorbado el estudio de la biología molecular vegetal. Esta biología molecular vegetal ha avanzado principalmente por el aprovechamiento de un plásmido bacteriano llamado Ti. Este plásmido, de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* del suelo, puede transformar muchas clases de plantas. El ADN transformador (ADN-T) del plásmido Ti se puede incorporar en un vector compatible con *E. coli* para producir vectores lanzadera de *E. coli* vegetal. A continuación se inserta el ADN ajeno en el ADN-T en una región no esencial, y el plásmido recombinante puede transformar a *A. tumefaciens*. Cuando la bacteria infecta a una planta, pasa el ADN-T a una célula de la planta, y el ADN-T se integra al genoma del huésped. En la célula infectada de la planta, la expresión del gen ajeno es controlada por un promotor, antes del sitio de clonación de ADN-T. En la figura 23.14 de la página siguiente se ve un ejemplo de clonación de ADN-T. Aunque esta técnica causa la inserción del ADN ajeno sólo en una célula, sigue siendo valioso en la mejora de cultivos; el gen ajeno que confiere la mejora se puede transferir a una planta completa, porque las plantas se pueden regenerar a partir de tejido diferenciado. Por ejemplo, las células de un trozo pequeño de hoja se pueden desdiferenciar, proliferar y volver a diferenciar para formar toda una planta. Cuando el fragmento de hoja se infecta con un plásmido de ADN-T recombinante, o proviene de una planta infectada, se transforma toda célula de la planta regenerada, incluyendo las células que fabrican polen y semillas.

La tecnología de clonación con ADN-T se ha usado para introducir numerosos genes para resistencia a herbicidas en genomas de cloroplasto y nuclear de plantas. Este método puede permitir el control de malas yerbas, usando herbicidas seguros para el ambiente. La resistencia a los herbicidas se modifica, ya sea alterando la enzima objetivo del herbicida (con frecuencia codificada por ADN de cloroplasto) o introduciendo genes vegetales o bacterianos cuyos productos catabolicen al herbicida. Por ejemplo, una cepa de la bacteria *Klebsiella pulmoniae* contiene un plásmido que codifica una nitrilasa muy específica para el herbicida boroxinil (un derivado de benzonitrilo). Eso permite que las bacterias usen bromoxinil como fuente de nitrógeno y se destoxifiquen. La transferencia del gen de nitrilasa a plantas de jitomate produce plantas transgénicas que son resistentes al herbicida. De igual modo, la resistencia a los daños de insectos se ha modificado introduciendo en las plantas el gen de una toxina de insectos (figura 23.15, página siguiente).

B. Ingeniería genética en procariotas

El Proyecto Genoma Humano (recuadro 23.1) ha atraído muchas expectativas en las publicaciones científicas y populares. Sin embargo, también es notable el avance, por lo general ignorado, en la comprensión de la bioquímica de las bacterias.

En una época de enfermedades infecciosas emergentes, cuando la eficacia de muchos antibióticos está decreciendo por el desarrollo de la resistencia bacteriana, crece en importancia la investigación sobre genómica bacteriana. La secuencia de un genoma bacteriano que primero se publicó fue la de *Haemophilus influenzae* en 1995. En menos de cinco años se completaron las secuencias de los genomas de más de 30 microorganismos.

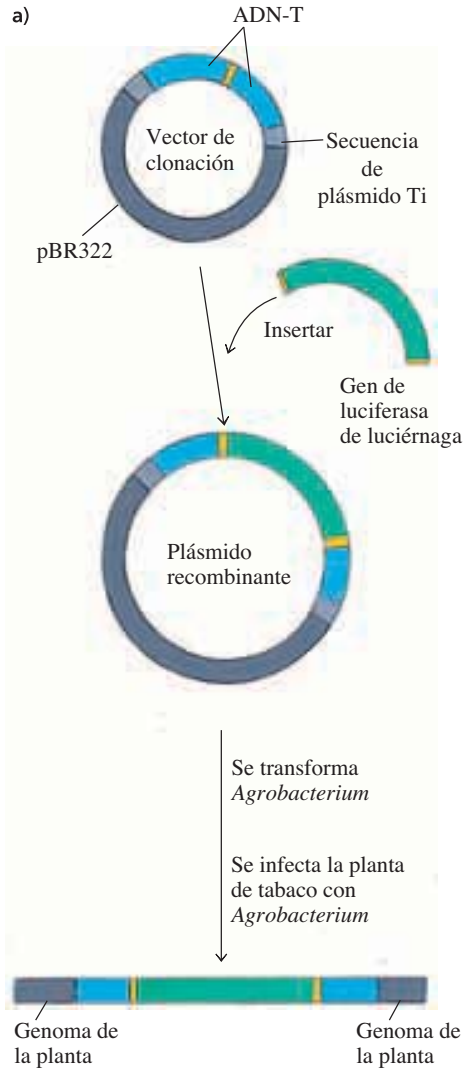


Figura 23.14 ▲
Introducción de ADN ajeno en plantas. **a)** El vector de clonación es un plásmido que lleva secuencias esenciales para replicación y selección en *E. coli* y también secuencias de plásmido Ti. El ADN ajeno se puede insertar en este vector, y en último término integrarse al genoma de la planta huésped. En este ejemplo, el gen de luciferasa de una luciérnaga se transforma en una planta de tabaco, usando el plásmido Ti. **b)** Al regar la planta con una solución de luciferina (sustrato de la luciferasa de luciérnaga), se produce la generación de luz en todos los tejidos de la planta. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

Figura 23.15 ▶
Plantas de jitomate resistentes a insectos. La planta de la izquierda contiene un gen que codifica una proteína bacteriana que es tóxica para ciertos insectos que se alimentan de plantas de jitomate. La planta de la derecha es de tipo silvestre. Sólo la planta de la izquierda puede crecer expuesta a los insectos.

Esos estudios pueden apoyar mucho a la microbiología, en particular porque ayudan a contestar la pregunta de cómo el genoma determina la función. Las comparaciones entre secuencias de genoma de distintos organismos contribuyen a comprender la evolución y la filogenia. Las comparaciones de genoma también son útiles para comprender cómo distintas cepas del mismo género pueden diferir en virulencia o en el tejido infectado. Además de permitir una mejor comprensión de la biología y fisiología microbiana, esas investigaciones en genomas bacterianos pueden ayudar al desarrollo de medicinas eficaces contra patógenos.

23.10 Aplicaciones a enfermedades humanas

Como se ha explicado, la sobreproducción de proteínas es una de las principales aplicaciones de la tecnología de ADN recombinante. Se pueden aislar los genes o las moléculas de ADNc para una proteína de interés, y clonarlos en vectores de expresión, y fabricar el producto genético en gran cantidad para estudiarlo más o para usarlo en tratamiento. Varios productos genéticos terapéuticos, como insulina, las interleucinas, interferones, hormonas de crecimiento, eritropoyetina y el factor de coagulación VIII, se producen hoy en forma comercial a partir de genes clonados. En algunos casos esas proteínas se sintetizan en las bacterias; en otras, en animales transgénicos donde se pueden aislar de la sangre o los tejidos. Incluso hay mamíferos transgénicos que sintetizan proteínas ajenas en sus glándulas mamarias; las proteínas son secretadas cómodamente en la leche. Esos productos recombinantes tienden a causar menos riesgo de efectos adversos que los aislados de animales o cadáveres.

Hoy se conocen más de 3 000 enfermedades genéticas humanas, y muchas de ellas causan grandes sufrimientos. Se han localizado los genes para algunas de esas afecciones en cromosomas específicos mediante técnicas genéticas tradicionales. En algunos casos se han clonado y secuenciado los genes, y se han identificado las mutaciones específicas. Entre ellas están las mutaciones en los factores de coagulación hemática VIII y IX que causan la hemofilia; las mutaciones en hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa que están asociadas al síndrome de Lesch-Nyhan (recuadro 18.5), y mutaciones en genes de globina que causan muchas y variadas enfermedades, como la anemia falciforme y varias talasemias.

Una vez clonado un gen, es posible usarlo como sonda para descubrir si un individuo tiene determinado alelo. Sin embargo, aun sin genes clonados o un lugar identificado para una enfermedad genética, se está facilitando el diagnóstico con análisis genéticos de familias, con base en variaciones en la longitud de los fragmentos genómicos de restricción. Esos **polimorfismos de longitud de fragmento de restricción** (RFLP, *restriction fragment length polymorphism*) permiten seguir pautas de herencia de enfermedad en una familia. Un RFLP se detecta incubando el ADN fragmentado de muchos individuos con una sonda de ADN clonada, y examinando la pauta de los fragmentos de hibridación (figura 23.16, página siguiente). Aunque las secuencias de ADN en los individuos se conservan mucho, una diferencia hasta de un nucleótido puede introducir o abolir un sitio de restricción y cambiar mucho la pauta de los fragmentos de hibridamiento. Los polimorfismos más valiosos para selección genética o diagnóstico se deben a variaciones en una región del genoma cercana al gen afectado. Una vez que se ha asociado determinado polimorismo con una anormalidad, es posible identificar a los individuos afectados con gran exactitud. La selección genética se puede hacer en un individuo antes de que aparezcan los síntomas, o se puede usar al asesorar a probables padres sobre la posibilidad de concebir un hijo afectado. El análisis de RFLP seguido de desplazamiento por el cromosoma ha conducido a la identificación de las mutaciones causantes de varias enfermedades genéticas, incluyendo la distrofia muscular de Duchenne y la corea de Huntington; seguro vendrán otros a medida que se terminen más estudios de vinculación con ADN.

El análisis de RFLP también ha revolucionado a la medicina forense, porque puede diferenciar a una persona entre millones usando ADN de sangre seca, folículos pilosos o semen que se encuentren en la escena de un crimen. La pauta de fragmentos de restricción característicos de cada ser humano (excepto gemelos idénticos) y una com-

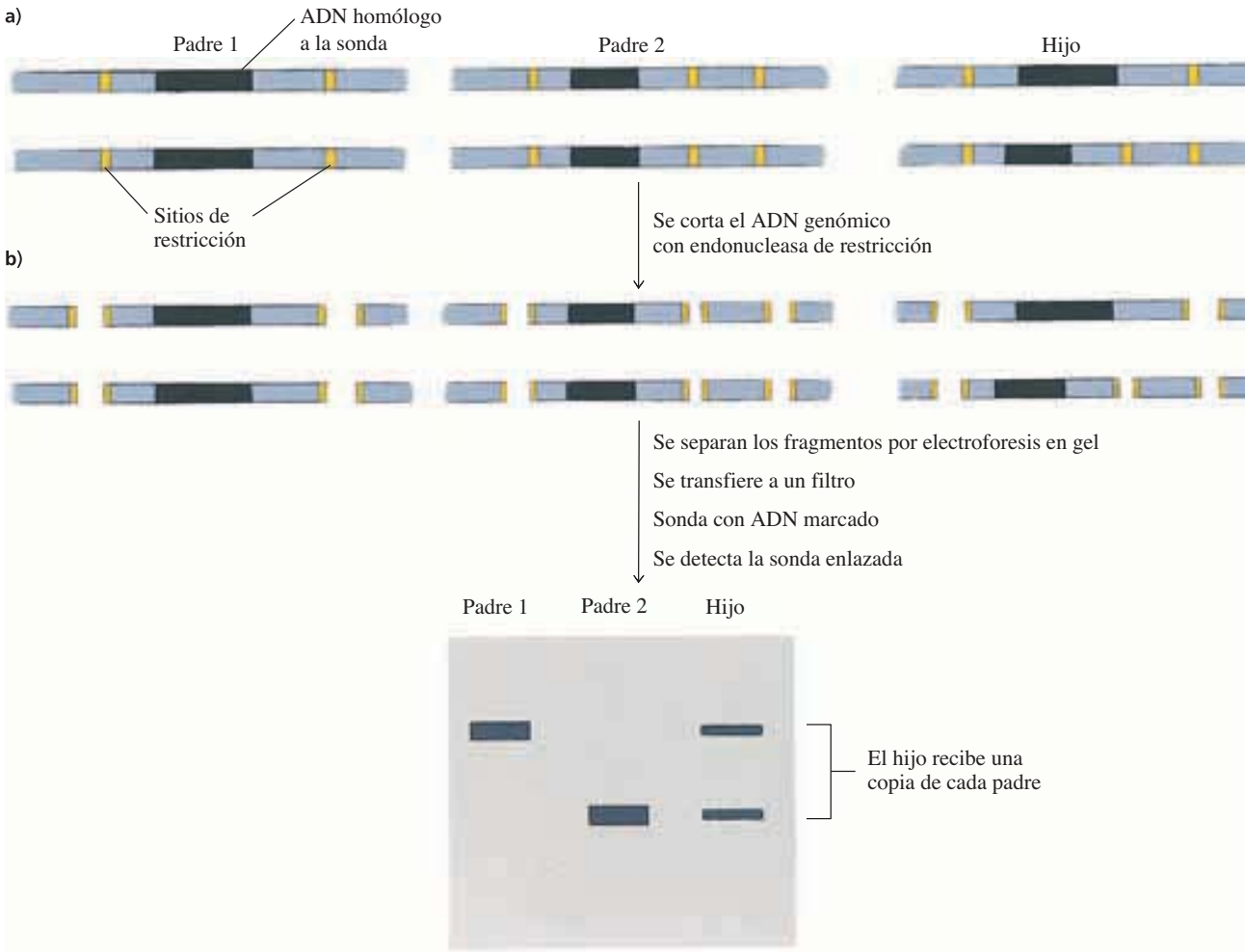


Figura 23.16 ▲
Detección de polimorfismos de longitud de fragmento de restricción (RFLP). **a)** Diagrama de una región de ADN homóloga a una sonda. La región homóloga en el padre 1 está en un solo fragmento de restricción grande; la misma región, en el padre 2, está en un fragmento menor debido a la presencia de un sitio adicional de restricción en el ADN del padre 2. El hijo de estos padres hereda una copia de la región de cada padre. **b)** El ADN de los tres individuos se digiere con una endonucleasa de restricción y se somete a electroforesis para separar los fragmentos por su tamaño. La sonda detecta la región homóloga de ADN de cada individuo. El ADN del padre 1 contiene dos copias del fragmento grande. El ADN del padre 2 contiene dos copias del fragmento pequeño, y el ADN de sus hijos contiene un fragmento de cada tamaño.

paración de pautas de sospechosos pueden usarse para identificar a los autores de los crímenes (sección 19.7).

El uso de ADN recombinante para tratar enfermedades es más discutido que su uso en diagnóstico. Es posible que se puedan curar muchos defectos genéticos humanos incorporando una versión silvestre clonada del gen mediante procedimientos parecidos a los que se usan para crear ratones transgénicos. También puede ser posible reemplazar genes, en forma sistemática, en determinadas células u órganos, como glóbulos de la sangre o en el hígado, para reparar defectos limitados a esos tipos celulares. El potencial benéfico de la terapia genética es enorme, siempre que se resuelvan los aspectos éticos que surgen por interferir con el genoma humano.

23.11 Amplificación de secuencias seleccionadas de ADN con la reacción en cadena de la polimerasa

La **reacción en cadena de la polimerasa** (PCR, *polymerase chain reaction*) es una valiosa herramienta para amplificar una cantidad pequeña de ADN o aumentar la proporción de determinada secuencia de ADN en una población de moléculas mezcladas de ADN. El uso de la tecnología de PCR evita la necesidad de tomar grandes muestras de tejido para obtener el ADN suficiente para secuenciar o clonar. La reacción en cadena de la polimerasa permite también producir una gran cantidad de copias de un gen que no se haya aislado, pero cuya secuencia se conozca. Por consiguiente, puede servir como alternativa a la clonación para amplificación de genes.

La técnica de la PCR se ilustra en la figura 23.17 de la página siguiente. Se usa la información de la secuencia en ambos lados del lugar deseado para construir cebadores de oligonucleótido que flanqueen a la secuencia de ADN que se amplificará. Los cebadores de oligonucleótido son complementarios a hebras opuestas, y sus extremos 3′ están orientados uno hacia el otro. El ADN de la fuente (que suele representar a todo el ADN en una célula) se desnaturaliza calentándolo en presencia de un exceso de oligonucleótidos. Al enfriar, los cebadores se unen de preferencia a sus sitios complementarios, que bordean a la secuencia de ADN que interesa. A continuación se extienden los cebadores usando una ADN polimerasa termoestable, como la *Taq* polimerasa de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*. Después de un ciclo de síntesis, se vuelve a calentar la mezcla de reacción para disociar las hebras de ADN, y se enfría para volver a reunir el ADN con los oligonucleótidos. Los cebadores se extienden de nuevo. En este segundo ciclo, dos de las cadenas recién sintetizadas de una hebra tienen precisamente la longitud del ADN entre los extremos 5′ de los cebadores. El ciclo se repite muchas veces, controlando con cuidado el tiempo y la temperatura de reacción. En cada ciclo, la cantidad de hebras cuyos extremos 5′ y 3′ se definen por los extremos de los cebadores aumenta en forma exponencial, en tanto que la cantidad de hebras de ADN que contienen secuencias fuera de la región limitada por los cebadores se eleva en forma aritmética. El resultado es que el ADN deseado se replica en forma preferente hasta que, después de 20 a 30 ciclos, forma la mayor parte del ADN en el tubo de ensayo. La secuencia del ADN deseado se puede clonar, secuenciar o usar como sonda para seleccionar una biblioteca de ADN recombinante.

RECUADRO 23.2 Usos médicos de la PCR

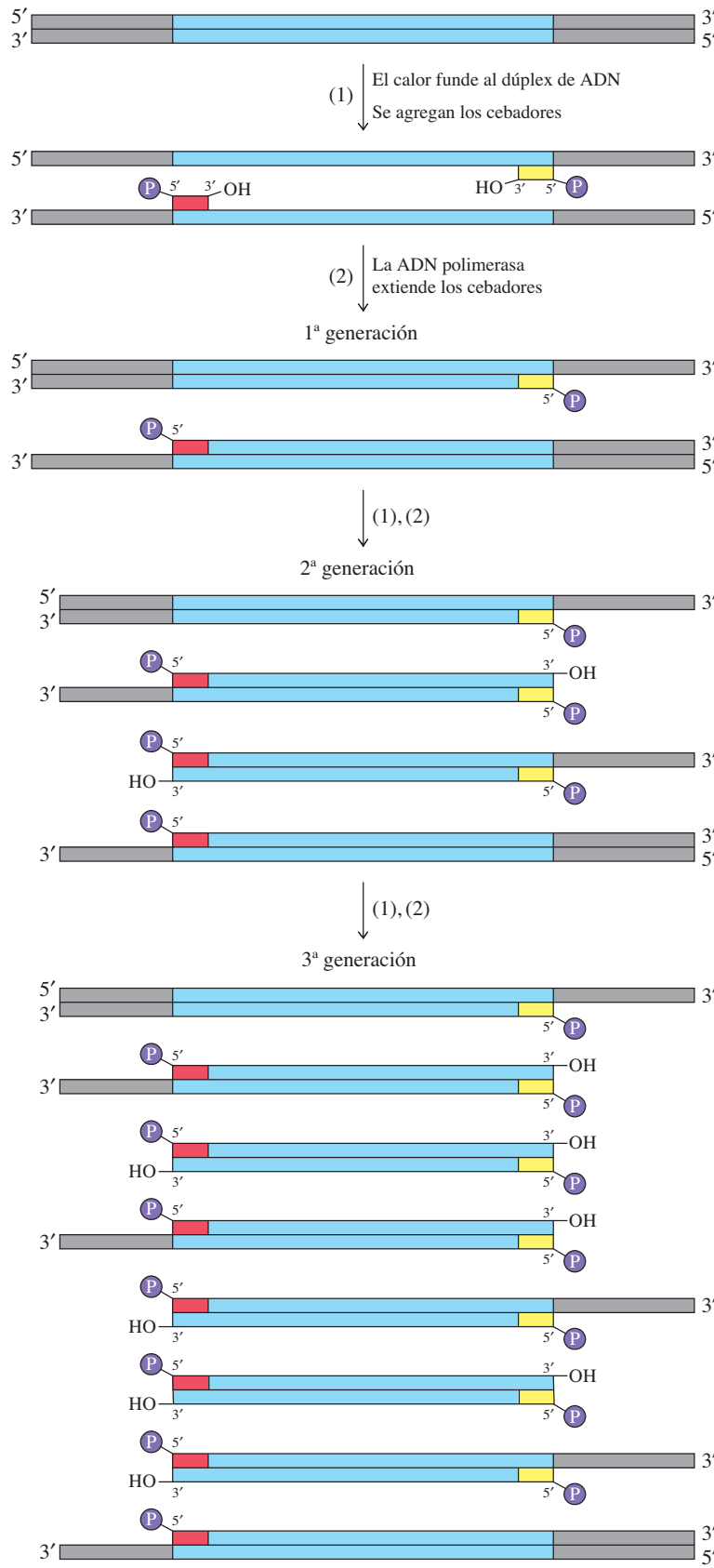
Además de su valor en muchas áreas de la investigación básica, la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa ha tenido gran impacto, tanto médico como en medicina forense. La posibilidad de usar muestras diminutas para determinaciones rápidas de una secuencia de ADN permite un pronto diagnóstico de muchas enfermedades infecciosas, determinar defectos genéticos en fetos o en nonatos, una vigilancia efectiva de la quimioterapia del cáncer y una mejor coincidencia de órganos de donantes y receptores. También ayuda a resolver casos de paternidad y legales.

Los métodos clásicos de diagnóstico de enfermedades bacterianas requerían cultivar un espécimen para después hacer análisis histológicos y químicos. Muchos microbios crecen con lentitud, y con frecuencia se debe dar tratamiento rápido a los pacientes. Muchas veces un análisis de anticuerpos no es eficaz, porque el organismo todavía no ha producido anticuerpos. La PCR permite la detección rápida de una cantidad pequeña de microorganismos, en forma directa a partir de especímenes clínicos. En esos análisis clínicos, los cebadores son complementarios de un gen específico característico de una especie patógena en particular. Si la muestra contiene ADN de esa especie, se amplificará un fragmento característico. Este fragmento amplificado se puede detectar con facilidad en un gel de agarosa, y su presencia demuestra la presencia de las bacterias.

Con la PCR se puede vigilar la quimioterapia del cáncer, localizando recurrencias o metástasis en etapa temprana por los métodos tradicionales. En algunas enfermedades, como las leucemias, la técnica puede permitir el análisis de la sangre periférica, en vez de la médula ósea. En este caso, la técnica de análisis se basa en la presencia de mutaciones conocidas o rearreglos de ADN presentes en la célula cancerosa, pero ausentes en las células normales. En el futuro, la PCR puede ayudar a la programación y al pronóstico de cánceres recién descubiertos, siempre que se conozca el defecto genético.

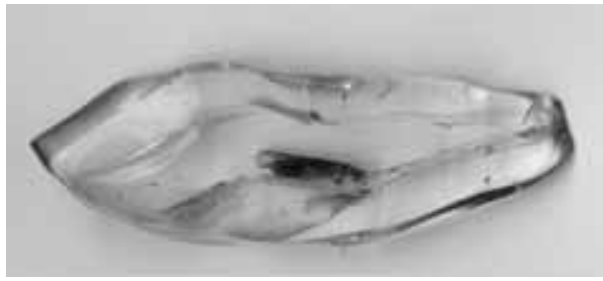
La PCR se usa para amplificar varios genes en casos de determinación de paternidad. La capacidad de amplificar y secuenciar ADN a partir de especímenes diminutos que haya en una escena de crimen es una bendición para la medicina forense (sección 19.7).

Figura 23.17 ▶
Tres ciclos de la reacción en cadena de polimerasa. La secuencia por amplificar se muestra en azul. 1) El ADN dúplex se funde por calentamiento y se enfría en presencia de un gran exceso de dos cebadores (rojo y amarillo) que flanquean la región de interés. 2) Una ADN polimerasa termoestable cataliza la extensión de esos cebadores, copiando cada hebra de ADN. Los ciclos sucesivos de calentamiento y enfriamiento en presencia de los cebadores permiten copiar la secuencia de interés hasta que, después de 20 a 30 ciclos, representa la mayor parte del ADN en la mezcla de reacción. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).



La PCR se usa mucho para estudiar evolución molecular, donde se requiere amplificar y clonar secuencias específicas de ADN de una gran cantidad de individuos. Se han analizado las secuencias de ADN mitocondrial de humanos en todo el mundo para determinar la evolución de nuestra especie. En este caso se aisló ADN de las células unidas a un solo folículo piloso, y se amplificó con PCR para analizarlas. Los resultados demuestran las relaciones evolutivas de las razas y poblaciones actuales y se deduce que *Homo sapiens* se originó en África hace unos 100 000 años.

También la PCR ha permitido a los investigadores amplificar (y por consiguiente secuenciar) el ADN residual en fósiles con millones de años de antigüedad. La fuente normal de ese ADN es tejido embebido en ámbar, como la hoja de 40 millones de años de antigüedad que se ve en la figura 23.18. También se ha recuperado ADN de tejidos menos antiguos, preservados del aire, como de la piel de las momias egipcias. El ADN de insectos con varios millones de años de antigüedad se ha amplificado con PCR y se ha secuenciado. La información obtenida permite formar árboles filogenéticos exactos.



◀Figura 23.18
Hoja de hace 40 millones de años conservada en ámbar. Con la reacción en cadena de polimerasa se amplificó y secuenció el ADN recuperado de este fósil.

23.12 Mutagénesis dirigida de ADN clonado

La mutagénesis dirigida (explicada en la sección 5.9) es una técnica poderosa que ha tenido gran impacto sobre estudios de estructura y función de genes y sus productos proteínicos. En esta técnica se altera la mutación deseada en forma directa en un gen sintetizando un oligonucleótido que contiene la mutación, flanqueada por secuencias idénticas a las del gen deseado. Cuando este oligonucleótido se usa como cebador para replicación de ADN *in vitro*, la nueva copia del gen contiene la mutación deseada. Ya que se pueden hacer alteraciones en cualquier posición en un gen, se pueden hacer cambios específicos en proteínas, lo que permite la prueba directa de hipótesis acerca del papel funcional de residuos clave de aminoácidos. (Naturalmente, también se podría sintetizar un gen mutante por completo *in vitro*, pero la mutagénesis dirigida al sitio es un método mucho más rápido para producir proteínas mutantes). La mutagénesis dirigida al sitio (figura 23.19, página siguiente) se usa con frecuencia para introducir en los genes mutaciones de un nucleótido, aunque si se aumenta la longitud del oligonucleótido sintético se permite la introducción de mayores faltas de coincidencia, e incluso inserciones o eliminaciones notables.

▲Michael Smith (1932-2000) recibió el Premio Nobel de Química en 1993 por sus trabajos sobre mutagénesis dirigida a sitios.

Los recombinantes mutantes deseados se pueden distinguir de los recombinantes silvestres si se clasifican o seleccionan los transformantes con una versión marcada del oligonucleótido que se usó para generar la mutación. Bajo condiciones muy estrictas de hibridamiento, este oligonucleótido, que ahora aparea sus bases por completo sólo con la secuencia mutante, se hibrida de preferencia con la secuencia mutante y no con la secuencia de tipo silvestre.

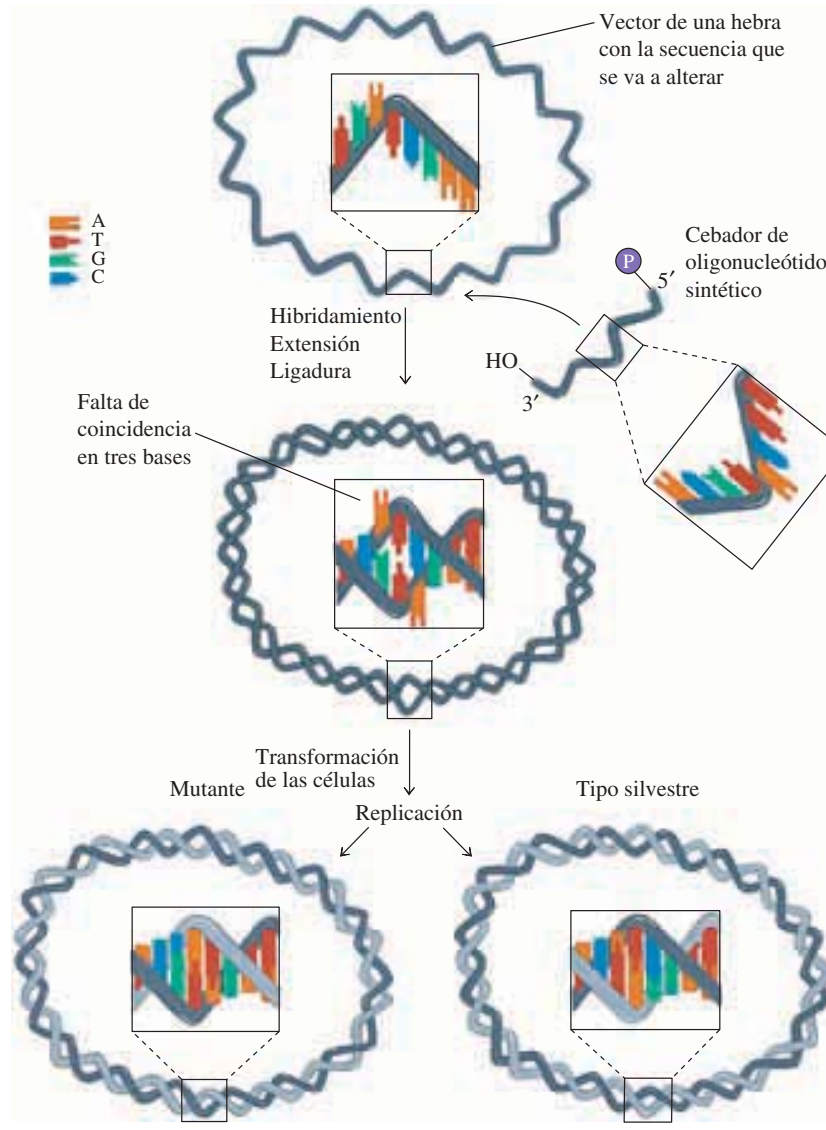


Figura 23.19 ▶
Mutagénesis dirigida a oligonucleótido, específica de sitio. Un oligonucleótido sintético que tiene el cambio deseado (3 pb) se une al vector de una hebra que contiene la secuencia que se va a alterar. El oligonucleótido sintético sirve como cebador para la síntesis de una hebra complementaria. El heterodúplex de doble hebra y circular se transforma en las células de *E. coli*, donde por replicación se producen moléculas de ADN de los tipos mutante y silvestre. (***Véase esta figura a todo color al final del libro***).

Resumen

1. La tecnología del ADN recombinante se basa en pocas técnicas fundamentales: aislamiento del ADN, división del ADN en secuencias particulares, ligación de los fragmentos de ADN, introducción de ADN en células huésped, replicación y expresión del ADN e identificación de las células huésped que contienen recombinantes.
2. Los fragmentos de ADN generados por endonucleasas de restricción se pueden ligar a una gran variedad de vectores de clonación, como plásmidos, bacteriófagos, virus o cromosomas artificiales.
3. Las células que contienen moléculas de ADN recombinante con frecuencia se seleccionan por la actividad de un gen marcador. Las células que contienen al recombinante deseado se identifican por selección o clasificación.
4. Una biblioteca genómica representa a todo el ADN de un organismo. Los fragmentos de ADN del tamaño adecuado se pueden empacar en vectores bacteriófagos, cromosomas artificiales de levadura o cromosomas artificiales bacterianos.
5. Una biblioteca de ADNc contiene ADN que es complementario al ARNm de determinada célula o tejido.
6. Las bibliotecas de ADN se pueden seleccionar usando sondas marcadas, como oligonucleótidos, ADNc clonado o anticuerpos.
7. Se usa desplazamiento del cromosoma para aislar y ordenar fragmentos físicamente lejanos de ADN genómico.
8. El producto de un gen que se ha incorporado a un vector adecuado de expresión se puede generar en células procarióticas

o eucarióticas. Los genes ajenos también se pueden incorporar en forma estable en los genomas de animales y plantas.

9. Los métodos de ADN recombinante permiten la introducción de proteínas para uso terapéutico y la identificación de individuos con defectos genéticos.

10. Se pueden amplificar secuencias específicas de ADN por la reacción en cadena de polimerasa.

11. La mutagénesis dirigida al sitio es una técnica para introducir una mutación deseada en un gen.

Problemas

1. Un fragmento de restricción *PstI* de ADN se mezcla con ADN pBR322 que se ha dividido con *PstI*. La mezcla se trata con ADN ligasa, y se usa para transformar un cultivo de células de *E. coli*. Una alícuota del cultivo se extiende en una placa de Petri que contiene tetraciclina. ¿Cuáles células formarán colonias? ¿Cómo se pueden identificar las células que contienen los plásmidos recombinantes?

2. Se insertan fragmentos de ADN genómico en un plásmido vector y se usa el ADN recombinante para transformar células de *E. coli* que contienen una mutación del gen *leuB*. El gen *leuB* codifica β-isopropilato deshidrogenasa, enzima necesaria para la síntesis de la leucina. Las cepas bacterianas que son *leuB*$^-$ son incapaces de crecer en medios que carezcan de leucina. Explique por qué algunas de las células transformadas pueden formar colonias en ausencia de leucina. ¿Qué se puede concluir acerca de la organización y función del gen de levadura que está presente en las células que forman colonias?

3. Al eliminar el origen de replicación de levadura en un vector lanzadera de levadura-*E. coli* se reduciría en forma drástica la cantidad de colonias de levadura obtenidas después de transformar el nuevo ADN en las células de levadura. ¿Podría usarse ese vector baldado para aislar regiones de ADN genómico de levadura que contiene orígenes cromosómicos de replicación?

4. ¿Cuántos clones recombinantes deben seleccionarse para tener 99% de certeza de que determinado gen se encuentre en una biblioteca YAC de ADN humano (el tamaño promedio del inserto es 300 kb)?

5. En muchos vectores de clonación, el extremo 5′ del gen *lac*Z de *E. coli* se ha modificado para incluir varios sitios de restricción, pero conservando el marco de lectura del gen.

a) Un fragmento de ADN (gris) con varios sitios de restricción se puede insertar en el gen *lac*Z como se ve abajo. Identifique los aminoácidos codificados por este tramo de ADN.

b) También se han obtenido los vectores que contienen el mismo inserto con orientación opuesta. Escriba la secuencia de este ADN e identifique los sitios de restricción y los codones de aminoácido.

6. El vector de clonación del problema 5a se corta con la endonucleasa de restricción *Sma*I, cuyo sitio de restricción es

Se inserta una molécula sintética de ADN de doble hebra cuya secuencia es

5′ T T A C A T A C T A C C C A A G T A 3′

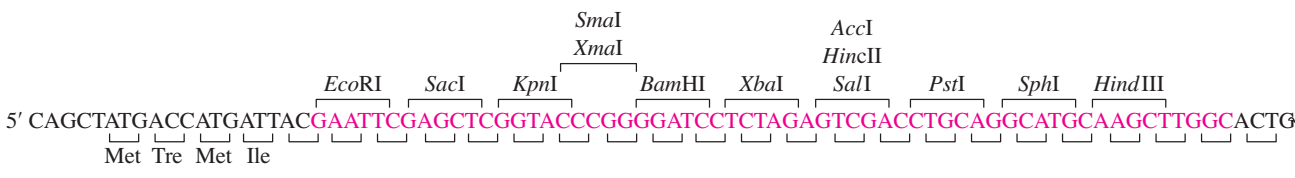
3′ A A T G T A T G A T G G G T T C A T 5′

en el sitio *Sma*I, que está dentro del gen de β-galactosidasa. La mezcla de ligadura se usa para transformar *E. coli*. En presencia del indicador X-gal, la mitad de las colonias son azules y la otra mitad son blancas. Describa la explicación más probable de este resultado.

7. Además de tener un origen de replicación, marcadores seleccionables y sitios útiles de división con enzima de restricción, el popular vector pBR322 tiene un gen pequeño llamado rop. Si se rompe pBR322 con *Pvu*II y se inserta un enlazador de 8 pb (GGCGCGCC) en ese sitio se inactiva el gen *rop* (cambia de marco de lectura). ¿Qué efecto, si es que lo hay, tendría la manipulación después de reintroducir el ADN de plásmido modificado en células de *E. coli*?

8. Con frecuencia, los productos genéticos ajenos son tóxicos para sus huéspedes bacterianos. Para obviar este problema potencial, algunos vectores de expresión de *E. coli* tienen un promotor regulado estrictamente (por ejemplo, el promotor derecho P_R del bacteriófago λ). ¿Se esperaría poder propagar ese plásmido que tiene P_R en una cepa de huésped lisogénica para λ? ¿Por qué?

9. Se desea expresar determinada proteína humana para usarla en estudios científicos posteriores. Usted tiene la secuencia del gen para la proteína, y debe elegir un sistema de expresión. La proteína tiene varios residuos glicosilados, y es necesaria la presencia del carbohidrato para que funcione la proteína. También tiene la opción de un sistema de expresión bacteriano o de levadura. ¿Cuál debe usar y por qué?



10. Los sitios de reconocimiento para las endonucleasas de restricción *Bgl*II y *Bam*H1 se muestran a continuación. ¿Por qué es posible construir moléculas de ADN recombinante combinando ADN blanco dividido con *Bgl*II y un vector cortado con *Bam*H1?

```
    ↓           ↓
AGATCT      GGATCC
Bglll       BamHI
```

11. Uno de los primeros pasos en la construcción de una biblioteca de ADN genómico es aislar ADN de células y generar fragmentos que sean adecuados para clonar. Los fragmentos generados por corte mecánico son difíciles de clonar, porque deben insertarse en un vector en un sitio de restricción que produzca extremos romos. Es mucho más eficaz clonar fragmentos de restricción con extremos cohesivos. Sin embargo, el corte mecánico a menudo es el método que se prefiere para fragmentar ADN genómico. Explique por qué es así.

12. La termófila *Thermus aquaticus* es la fuente no sólo de ADN polimerasa termoestable (la llamada *Taq* polimerasa que se usa con frecuencia en la PCR), sino también de una enzima de restricción termoestable tipo II llamada *Taq*I que reconoce y rompe la secuencia palindrómica de 4 pb TCGA. Usted tiene un pequeño fragmento del gen *Taq*I y desea obtener una copia de toda la longitud para secuenciar el gen (sería útil para estudios de evolución de enzimas tipo II, así como un preludio a estudios de estructura y función de la proteína; por ejemplo, se podría terminar usando mutagénesis dirigida a sitio del gen clonado, para definir residuos clave de aminoácidos importantes para la función). Se corta mecánicamente ADN genómico de *T. aquaticus* y se ligan los fragmentos resultantes en pBR322 que se ha dividido con la enzima *Sca*I (hay un solo sitio *Sca* ubicado a la mitad del gen Amp^R y esta enzima deja extremos romos). La transformación de esta mezcla a *E. coli* da como resultado muchas colonias Tet^R. Para identificar los clones que contienen al gen *Taq*I se procede a hacer muestreos de colonia y sondearlos con el fragmento genético marcado que ya se tenía. Es extremadamente difícil encontrar colonias positivas en este experimento. ¿Por qué? (Suponga que se llevó a cabo cada paso de la clonación en forma exacta y competente).

13. Una de las cepas huésped de *E. coli* que se usan en tecnología de ADN recombinante lleva genes defectuosos para varias endonucleasas de restricción y para RecA. ¿Por qué es útil esa cepa?

14. En 1995, Edward Lewis ganó el Premio Nobel por sus trabajos sobre genes que controlan el desarrollo en *Drosophila melanogaster*, como los genes del grupo *bithorax*, que están cerca del extremo del cromosoma 3. A fines de la década de 1970, fue clonado un fragmento de ADN de *Drosophila* a varios cientos de kb de distancia de los genes de *bithorax*. Explique cómo este fragmento, subproducto accidental de otro experimento permitió clonar los genes de *bithorax* en 1983.

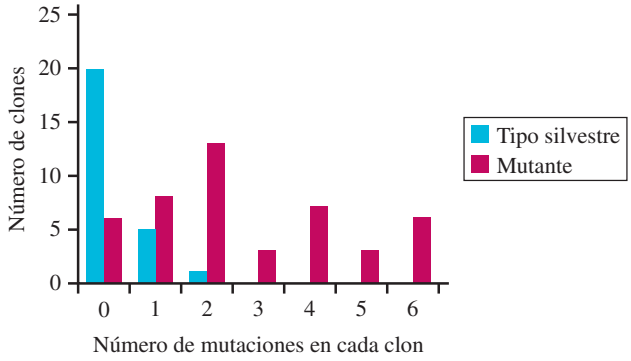
15. Una de las metas originales del Proyecto Genoma Humano fue preparar un mapa detallado de vínculos de los cromosomas humanos. Muchos fragmentos clonados de ADN (llamados etiquetas de secuencia expresada, o EST, expressed sequence tag) se han localizado en regiones particulares de los cromosomas. ¿Por qué las etiquetas son útiles para clonar los genes responsables de enfermedades genéticas?

16. Su compañero de laboratorio ha designado un experimento de PCR idéntico al que muestra la figura 23.17, excepto que por error usó dos cebadores oligonucleótidos que eran complementarios a los que indica la figura (es decir, se hibridan al sitio correcto, pero en la hebra opuesta de ADN). ¿Seguirá amplificándose el producto deseado por PCR? ¿Por qué?

17. La figura 23.16 muestra cómo se usa el análisis RFLP para determinar la paternidad. Cada padre, en este ejemplo, es homocigoto para ese lugar polimórfico (en tanto que el hijo es heterocigoto). ¿Qué se puede deducir acerca del estado del lugar en cada uno de los cuatro abuelos ancestrales?

18. Las plantas genéticamente modificadas pueden tener mayores rendimientos al generar especies resistentes a enfermedades, insectos y sustancias químicas. Uno de los genes más usados para modificar cultivos de maíz codifica la endotoxina de Bacillus thuringiensis (toxina Bt). La toxina Bt es destructiva para las mariposas y polillas, dos plagas que se sabe destruyen cultivos de maíz. Sugiera una técnica que pueda usarse para detectar la presencia de material genéticamente modificado que contenga la toxina Bt en productos alimenticios comunes hechos de maíz.

19. Usted trabaja para una empresa de biotecnología que trata de modificar genéticamente la polimerasa Taq para usarla en sus estuches comerciales de PCR. Se trata de producir una enzima que trabaje más rápido y sea más estable durante el curso de una reacción de PCR que la polimerasa Taq que hoy se vende en los estuches comerciales de PCR. Se obtuvieron los siguientes resultados para la polimerasa Taq que se usa en la actualidad en esos estuches (tipo silvestre) y una enzima donde se cambió el aminoácido 614, de isoleucina a lisina (mutante). Se usó un sistema en el que con cada polimerasa se amplificó un gen objetivo por PCR. Los productos de las reacciones se aislaron por electroforesis y se pusieron en un vector de clonación para su expresión en bacterias. A continuación se purificaron y secuenciaron vectores de varias colonias bacterianas. Los resultados se ven en la siguiente figura (Patel, P. H., Kawate, H., Adman, E., Ashbach, M. y Loeb, L. A. 2001. A single highly mutable catalytic site amino acid is critical for DNA polymerase fidelity. J. Biol. Chem. 276:5044-5051.) ¿Se debe seguir investigando la polimerasa Taq mutante como reemplazo de la enzima silvestre en los estuches comerciales de PCR? Explique por qué.



Lecturas seleccionadas

Generalidades

Alcamo, I. E. y Alcamo, E. I. (2000). *DNA Technology: The Awesome Skill,* 2nd ed. (New York: Academic Press).

Glick, B. R. y Pasternak, J. J. (1994). *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA* (Washington, D C: American Society for Microbiology).

Watson, J. D., Gilman, M., Witkowski, J. y Zoller, M. (1992). *Recombinant DNA*, 2nd ed. (New York: W. H. Freeman).

Amplificación de ADN

Burkardt, H. J. (2000). Standardization and quality control of PCR analyses. *Clin. Chem. Lab. Med.* 38:87-91. Un vistazo hacia algunos errores y precauciones en el uso de la PCR.

Mullis, K. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.* 262(4):56-65.

Genomas

Dunham, I. (2000). Genomics: the new rock and roll? *Trends Genet.* 16:456-461. Relación personal de la secuenciación del genoma humano.

Dunham, I., Shimizu, N., Roe, B. A., Chissoe, S. et al. (1999). The DNA sequence of human chromosome 22. *Nature* 402:489-495. La primera secuenciación de un cromosoma humano.

Frederick, R., Blattner, F. R. et al. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277:1453-1462. Crónica de la secuenciación de un genoma bacteriano con una discusión sobre su significado.

International Human Genome Sequencing Consortium. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921.

Pennisi, E. (2000). Finally, the book of life and instructions for navigating it. *Science* 288:2304-2307. Relación de la historia, política y futuro del Proyecto Genoma Humano.

Schwartz, I. (2000). Microbial genomics: from sequence to function. *Emerg. Infect. Dis.* 6(5):493-495.

Venter, J. C., Adams, M. D. et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291:1304-1354.

Aplicaciones clínicas

Bello, E. A. (1996). Molecular biology and medicine: a primer for the clinician. *Anesthesiology* 85(6):1462-1478. Perspectiva de algunos de los prospectos, dificultades y riesgos de la terapia genética.

Kohn, D. B. (2000). Gene therapy for T-cell immunodeficiencies. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 20:221-235. Una actualización sobre el uso de la terapia genética en diversas inmunodeficiencias hereditarias, incluyendo deficiencia de adenosina desaminasa.

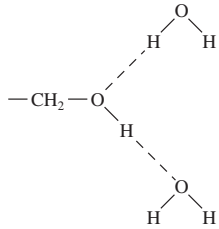
Wivel, N. A. (1998). Methods of gene delivery. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 12:483-501. Desarrollo y uso de vectores para transporte de genes en terapia genética clínica.

Soluciones

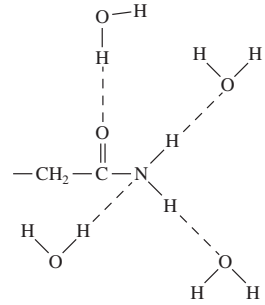
Capítulo 2
El agua

1. En los puentes de hidrógeno intervienen átomos fuertemente electronegativos, como nitrógeno, oxígeno o azufre.

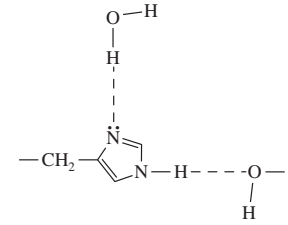
a)



b)



c)



2. a) El glicerol es polar; no es anfipático y se disuelve con facilidad en agua.
b) El fosfato de hexadecanoílo es polar, es anfipático y no se disuelve con facilidad en agua, pero forma micelas.
c) El laurato es polar, es anfipático y no se disuelve con facilidad en agua, pero forma micelas.
d) La glicina es polar, no es anfipática y se disuelve con facilidad en agua.

3. En el interior de las células hay una presión osmótica mayor que en el exterior, porque la concentración molar de los solutos es mucho mayor dentro de las células que fuera de ellas. Eso causa que el agua se difunda hacia las células y haga que se hinchen y estallen.

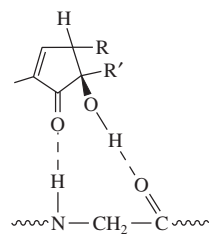
4. Si el pH de una solución es *menor* que el pK_a de algún grupo ionizable dado, la especie predominante será la que tenga el protón disociable *en ese grupo*. Si el pH de una solución es *mayor* que el pK_a de un grupo ionizable dado, la especie predominante será la que tenga el protón disociable *alejado de ese grupo*.
a) pH = 11, donde predomina la forma $-COO^{\ominus}$.
b) pH = 2, donde predomina la forma $H^{\oplus}$.
c) pH = 2, donde predomina la forma $H^{\oplus}$.
d) pH = 11, donde predomina la forma $R-O^{\ominus}$.

5. a) Jugo de tomate. Para pH = 4.2, si pH = $-\log [H^{\oplus}]$, entonces
$[H^{\oplus}] = 10^{-pH}[H^{\oplus}] = 10^{-4.2} = 6.3 \times 10^{-5}$ M.
La constante de producto iónico del agua (K_w) relaciona las concentraciones de $OH^{\ominus}$ y $H^{\oplus}$ (ecuación 2.6).
$[OH^{\ominus}] = K_w)/[H^{\oplus}] = 1.0 \times 10^{-14}\ M^2/6.3\ x^{-5}\ M = 1.6 \times 10^{-10}$ M.

b) Plasma humano. Si el pH = 7.4, entonces
$[H^{\oplus}] = 10^{-7.4} = 4.0 \times 10^{-8}$ M. $[OH^{\ominus}] = K_w/[H^{\oplus}] =$
$1.0 \times 10^{-14}\ M^2/4.0\ x10^{-8}\ M = 2.5 \times 10^{-7}$ M.

c) Amoniaco 1M. Si el pH = 11.7, entonces
$[H^{\oplus}] = 10^{-11.7} = 2.0 \times 10^{-12}$ M. $[OH^{\ominus}] = K_w/[H^{\oplus}] =$
$1.0 \times 10^{-14}\ M^2/2.0\ x^{-12}\ M = 5 \times 10^{-3}$ M.

6.



7. Especies amortiguadoras totales = [ácido débil (HA)] + [base conjugada ($A^{\ominus}$)]

Concentración total del amortiguador = 0.25 M + 0.15 M = 0.4 M.

El pH se puede calcular a partir del pK_a y las concentraciones dadas usando la ecuación de Henderson-Hasselbalch.

$$pH = pK_a + \log\frac{[A^{\ominus}]}{[HA]} = 3.90 + \log\frac{(0.15\ M)}{(0.25\ M)} = 3.90 - 0.22 = 3.68$$

8. El pK_a para la ionización del $H_2PO_4^{\ominus}$ es 7.2. La ecuación de Henderson-Hasselbalch (ecuación 2.18) indica que cuando las concentraciones de la forma ácida ($H_2PO_4^{\ominus}$) y de su base conjugada ($HPO_4^{2\ominus}$) son equivalentes, el pH es igual al pK_a, porque el término log es cero (log 1 = 0). Por consiguiente, al mezclar 50 mililitros de solución A con 50 mililitros de solución B se obtiene un amortiguador de pH 7.2. Como la concentración de cada solución es 0.02 M, al mezclar volúmenes iguales se obtiene un amortiguador cuya concentración de fosfato también es 0.02 M. La razón por la que es un amortiguador eficaz es que el pH final está en el valor de pK_a. Esto quiere decir que el amortiguador resistirá cambios de pH dentro de límites amplios.

9. a) Los límites efectivos de un amortiguador van desde aproximadamente una unidad de pH abajo hasta una unidad de pH arriba del pK_a. El intervalo de amortiguación de MOPS es entonces de 6.2 a 8.2, y el intervalo de amortiguación del SHS es de 4.5 a 6.5. Se aplica la ecuación de Henderson-Hasselbalch para calcular las relaciones de especies básicas a especies ácidas.

Para MOPS: $pH = pK_a + \log\dfrac{[R_3N]}{[R_3NH^{\oplus}]}$

$$6.5 = 7.2 + \log\frac{[R_3N]}{[R_3NH^{\oplus}]}$$

$$\frac{[R_3N]}{[R_3NH^{\oplus}]} = \frac{1}{5}$$

Para SHS:

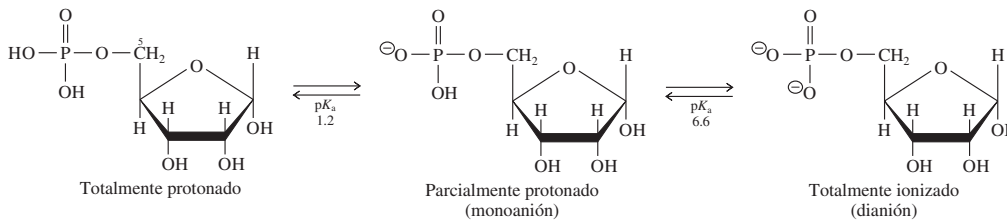
$$6.5 = 5.5 + \log\frac{[RCOO^{\ominus}]}{[RCOOH]}$$

$$\frac{[RCOO^{\ominus}]}{[RCOOH]} = \frac{10}{1}$$

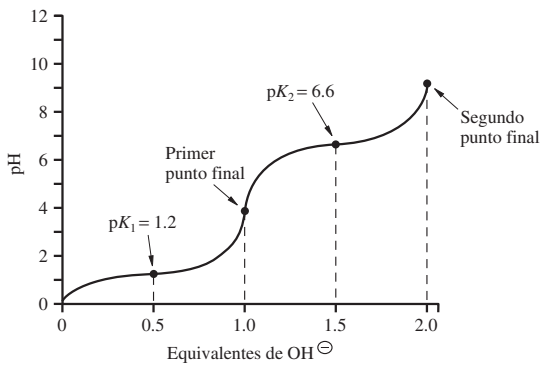
b) Una solución amortiguadora de SHS a pH 6.5 contiene una proporción mucho mayor de base conjugada en relación al ácido (10:1) que el MOPS (1:5). Por consiguiente, un amortiguador de SHS sería más eficaz para mantener el pH frente a la adición de un ácido. $H^{\oplus} + RCOO^{\ominus} \rightleftharpoons RCOOH$. A la inversa, un regulador de MOPS a pH 6.5 contiene mayor proporción de ácido que el SHS; por consiguiente, el MOPS mantendría con más eficacia el pH ante la adición de una base: $R_3NH^{\oplus} + OH^{\ominus} \rightleftharpoons R_3N + H_2O$.

10.

a)



b)



11. El exceso de CO_2 gaseoso se equilibra rápidamente con el CO_2 acuoso (ecuación 2.25) y causa la formación de ácido carbónico (ecuación 2.23). El ácido carbónico se ioniza en $H^{\oplus}$ y $HCO_3^{\ominus}$ (ecuación 2.22). El exceso de ácido, en la forma de $H^{\oplus}$, se puede acumular en los fluidos corporales y producir acidosis.

12. Aunque el metabolismo del lactato y de otros ácidos orgánicos en la dieta puede causar la producción de CO_2 como se mostraba, el CO_2 se expira con eficiencia de los pulmones (excepto durante la acidosis respiratoria). Así, el producto neto del proceso metabólico es el bicarbonato $(HCO_3^{\ominus})$, que es una base. Un exceso de $H^{\oplus}$ presente durante la acidosis metabólica puede eliminarse cuando se combina con $HCO_3^{\ominus}$ para formar H_2CO_3 (ecuación 2.22), que entonces forma CO_2 acuoso y H_2O (ecuación 2.23).

13. Las especies ácida y base conjugada de la aspirina se pueden representar por RCOOH y $RCOO^{\ominus}$, respectivamente. Si se aplica la ecuación de Henderson-Hasselbalch para calcular la relación de las dos especies a pH 2.0 y pH 5.0. Entonces se calcula la fracción de la especie total que no está ionizada y está disponible para su absorción. En el estómago, a pH 2.0,

$$\mathrm{pH} = \mathrm{p}K_a + \log\frac{[\mathrm{RCOO}^{\ominus}]}{[\mathrm{RCOOH}]}$$

$$2.0 = 3.5 + \log\frac{[\mathrm{RCOO}^{\ominus}]}{[\mathrm{RCOOH}]}$$

$$\frac{[\mathrm{RCOO}^{\ominus}]}{[\mathrm{RCOOH}]} = \frac{0.03}{1}$$

El porcentaje de la especie inalterada (RCOOH) es igual a la cantidad de RCOOH dividida entre el total de RCOOH y $RCOO^{\ominus}$, multiplicada por 100%.

$$\frac{[\mathrm{RCOOH}]}{[\mathrm{RCOOH}] + [\mathrm{RCOO}^{\ominus}]} \times 100\% = \frac{1}{1 + 0.03} \times 100\% = 97\%$$

Por consiguiente, casi toda la aspirina en el estómago está en forma adecuada para su absorción. Sin embargo, en el intestino superior el pH es 5.0, y sólo hay un pequeño porcentaje de la aspirina disponible para su absorción.

$$5.0 = 3.5 + \log\frac{[\mathrm{RCOO}^{\ominus}]}{[\mathrm{RCOOH}]}$$

$$\frac{[\mathrm{RCOO}^{\ominus}]}{[\mathrm{RCOOH}]} = \frac{32}{1}$$

$$\frac{[\mathrm{RCOOH}]}{[\mathrm{RCOOH}] + [\mathrm{RCOO}^{\ominus}]} \times 100\% = \frac{1}{1 + 32} \times 100\% = 3\%$$

Nótese que la aspirina debe estar en solución para ser absorbida. Por esta razón, las formas recubiertas o de liberación lenta de la aspirina pueden alterar la disponibilidad de ésta en el estómago y en el intestino.

14. Se aplica la ecuación de Henderson-Hasselbalch para calcular la relación de las dos especies a cada pH.

$$\text{At pH} = 7.5$$

$$\mathrm{pH} = \mathrm{p}Ka + \log\frac{[\mathrm{H_2NCH_2CONH_2}]}{[^{+}\mathrm{H_3NCH_2CONH_2}]}$$

$$7.5 = 8.2 + \log\frac{[\mathrm{H_2NCH_2CONH_2}]}{[^{+}\mathrm{H_3NCH_2CONH_2}]}$$

$$\log\frac{[\mathrm{H_2NCH_2CONH_2}]}{[^{+}\mathrm{H_3NCH_2CONH_2}]} = 7.5 - 8.2 = -0.7$$

$$\frac{[\mathrm{H_2NCH_2CONH_2}]}{[^{+}\mathrm{H_3NCH_2CONH_2}]} = \frac{1}{5}$$

La relación de $[H_2NCH_2CONH_2]$ para $[^{+}H_3NCH_2CONH_2]$ es 1 a 5. Para determinar el porcentaje en la forma de base conjugada: $1/(1 + 5)*100 = 17\%$. Por consiguiente, 17% no está protonado a pH de 7.5.

Para pH = 8.2

$$\text{pH} = \text{p}K\text{a} + \log\frac{[\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CONH}_2]}{[^+\text{H}_3\text{NCH}_2\text{CONH}_2]}$$

$$8.2 = 8.2 + \log\frac{[\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CONH}_2]}{[^+\text{H}_3\text{NCH}_2\text{CONH}_2]}$$

$$\log\frac{[\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CONH}_2]}{[^+\text{H}_3\text{NCH}_2\text{CONH}_2]} = 8.2 - 8.2 = 0$$

$$\frac{[\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CONH}_2]}{[^+\text{H}_3\text{NCH}_2\text{CONH}_2]} = \frac{1}{1}$$

La relación de $[\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CONH}_2]$ para $[^+\text{H}_3\text{NCH}_2\text{CONH}_2]$ es 1.0 a 1.0. Para determinar el porcentaje en la forma de base conjugada: $1/(1 + 1)*100 = 50\%$. Por consiguiente, 50% no está protonado a pH de 8.2.

Para pH 9.0:

$$\text{pH} = \text{p}K\text{a} + \log\frac{[\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CONH}_2]}{[^+\text{H}_3\text{NCH}_2\text{CONH}_2]}$$

$$9.0 = 8.2 + \log\frac{[\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CONH}_2]}{[^+\text{H}_3\text{NCH}_2\text{CONH}_2]}$$

$$\log\frac{[\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CONH}_2]}{[^+\text{H}_3\text{NCH}_2\text{CONH}_2]} = 9.0 - 8.2 = 0.8$$

$$\frac{[\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CONH}_2]}{[^+\text{H}_3\text{NCH}_2\text{CONH}_2]} = \frac{6.3}{1}$$

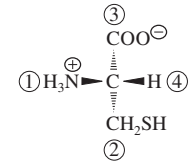
La relación de $[\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CONH}_2]$ para $[^+\text{H}_3\text{NCH}_2\text{CONH}_2]$ es 6.3 a 1. Para determinar el porcentaje en la forma de base conjugada: $6.3/(6.3 + 1)*100 = 86\%$. Por consiguiente, 86% no está protonado a pH de 9.0.

15. Esta curva de titulación representa a un compuesto con dos valores de p*K*a, mostrados por las dos planicies (cerca de pH 2 y de pH 10). La glicina tiene dos valores de p*K*a, de 2.4 y 9.8.

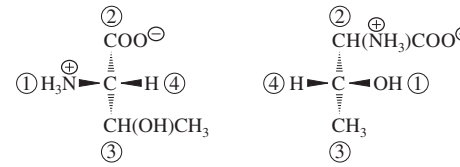
16. Sólo a) la vitamina C sería soluble en agua. La vitamina C contiene varios grupos hidroxilo, y cada uno de ellos puede formar un puente de hidrógeno con agua.

Capítulo 3
Los aminoácidos y la estructura primaria de las proteínas

1. Si se comparan las prioridades de L-cisteína (se ve aquí) con las de L-serina (configuración *S*, página 56) se encontrará que su secuencia tiene el sentido de las manecillas del reloj y en consecuencia la L-cisteína tiene la configuración *R*.

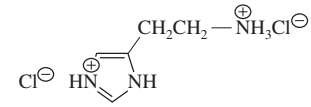


2. La estereoquímica de cada carbono quiral se debe examinar para determinar si tiene la configuración *R* o *S*.



C-2, configuración *S* C-3, configuración *R*

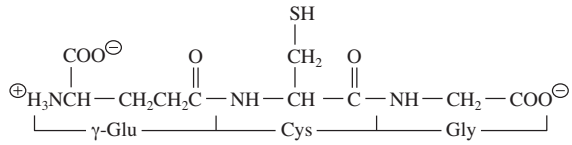
3.



4. Metionina.

5. a) Serina; fosforilación del grupo hidroxilo.
b) Glutamato; carboxilación del carbono-γ.
c) Lisina; acetilación el grupo ε-amino

6. Por convención, los péptidos se indican desde N-terminal → C-terminal; en consecuencia, Glu es el N-terminal y Gly es el C-terminal.

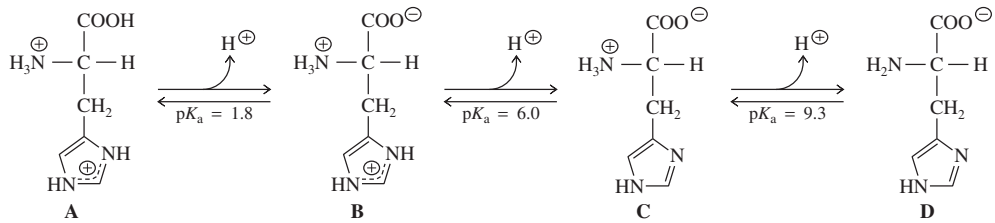


7. Los seis residuos en el C-terminal de la melitina son muy hidrofílicos (tabla 3.1). De los 20 residuos de aminoácido restantes, casi todos son hidrofóbicos, incluyendo nueve con cadenas laterales muy hidrofóbicas (leucina, isoleucina, valina). La parte hidrofílica de la melitina es más soluble en solución acuosa, en tanto que la parte hidrofóbica es más soluble en los lípidos de membrana.

8. Se usa la tabla 3.2 para determinar la carga neta en cada valor de pK_a. El pH al que la carga neta es 0 está a medio camino entre los dos valores de pK_a en los que las cargas promedio son +0.5 y −0.5.
a) A pH 9.0, la carga neta de la arginina es +0.5, y a pH 12.5 la carga neta es −0.5. Por consiguiente, $pI_{Arg} = (9.0 + 12.5) \div 2 = 10.8$.
b) A pH 2.1, la carga neta del glutamato es +0.5, y a pH 4.1 la carga neta es −0.5. Por consiguiente, $pI_{Glu} = (2.1 + 4.1) \div 2 = 3.1$.

9. Los grupos ionizables son el grupo amino libre del residuo N-terminal de cisteína $(pK_a = 10.7)$, la cadena lateral de glutamato $(pK_a = 4.1)$, y la cadena lateral de histidina $(pK_a = 6.0)$.
a) A pH 2.0, el N-términal y la cadena lateral de histidina tienen cargas positivas, y la cadena lateral de glutamato no tiene carga. La carga neta es +2.
b) A pH 8.5, el N-terminal tiene carga positiva, la cadena lateral de histidina no tiene carga, y la cadena lateral de glutamato tiene carga negativa. La carga neta es 0.
c) A pH 10.7, la carga del N-terminal es +0.5, la cadena lateral de histidina no tiene carga y la cadena lateral de glutamato tiene carga negativa. La carga neta es −0.5.

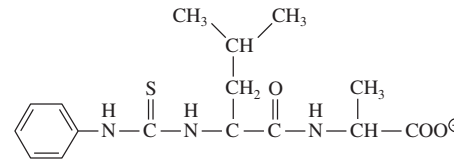
10. a)



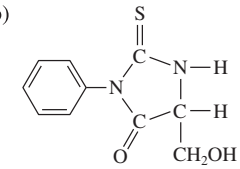
b) A, 1; B, 3; C, 5; D, 7
c) 1, 4, 5, 7
d) 4
e) 5
f) La histidina sería un buen amortiguador dentro de una unidad de pH en cualquiera de sus tres valores de pK_a: 0.8 a 2.8, 5.0 a 7.0 y 8.3 a 10.3.

11.

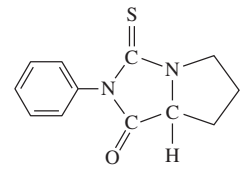
a)



b)



c)



12. a) Gly–Ala–Trp–Arg, Asp–Ala–Lys, Glu–Phe–Gly–Gln

b) Gly–Ala–Trp, Arg–Asp–Ala–Lys–Glu–Phe, Gly–Gln

c) Gly–Ala–Trp–Arg–Asp, Ala–Lys–Glu, Phe–Gly–Gln

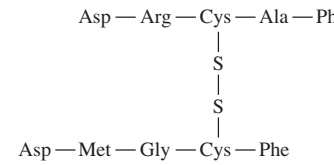
13. a) Como hay dos grupos N-terminales, debe haber dos cadenas peptídicas y cada una debe tener un residuo de aspartato N-terminal.

b) El 2-mercaptoetanol reduce los puentes de disulfuro, y la tripsina cataliza la ruptura en el lado del carboxilo de los residuos de arginina. Como hay aspartato en los dos N-terminales de FP, la secuencia del dipéptido es Asp-Arg, y la secuencia del pentapéptido es Asp-(Cys, Gly, Met, Phe). El tripéptido tiene la secuencia Cys-(Ala, Phe) y se deriva de la ruptura, catalizada por tripsina de un pentapéptido, cuya secuencia es Asp-Arg-Cys-(Ala, Phe).

c) El residuo C-terminal de cada cadena de péptido es fenilalanina. Ahora que se conocen los residuos terminales, un péptido debe tener la secuencia Asp-(Cys, Gly, Met)-Phe, y el otro debe tener la secuencia Asp-Arg-Cys-Ala-Phe.

d) El BrCN divide en el lado carbonilo de los residuos de metionina para producir residuos de lactona homoserina C-terminal. Por consiguiente, los péptidos son Asp-Met y (Cys, Gly)-Phe. La glicina es el residuo N-terminal del tripéptido, por lo que la secuencia del pentapéptido es Asp-Met-Gly-Cys-Phe.

La estructura completa de FP es

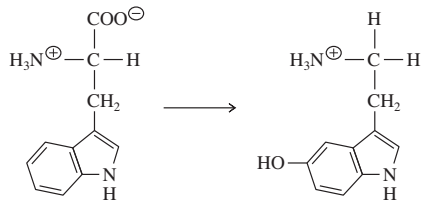


14. a) La sustitución de aspartato (D) por glutamato (E) en la posición 50 es un ejemplo de un cambio conservativo. Los aminoácidos aspartato y glutamato contienen cadenas laterales ácidas que tienen carga negativa a pH fisiológico.

b) La sustitución de la tirosina (Y) por histidina (H) es un ejemplo de sustitución no conservativa, porque la tirosina contiene una cadena lateral aromática, y la histidina contiene una cadena lateral hidrofílica, formada por un grupo imidazol.

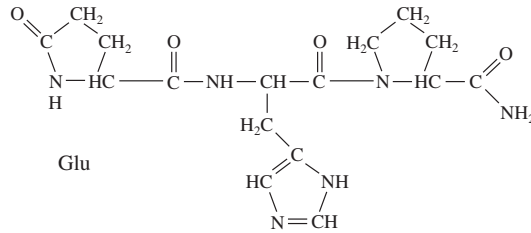
15. El neurotransmisor serotonina se deriva del aminoácido triptófano.

En la conversión, el grupo carboxilo del triptófano sale y se adiciona un grupo hidroxilo al anillo aromático.



Triptófano Serotonina

16. a) Hay dos enlaces peptídicos en la TRH. Están indicados con las líneas interrumpidas.
b) La TRH se deriva del tripéptido Glu-His-Pro. El grupo carboxilo de la prolina se ha modificado a una amida (se marca con un *). El grupo carboxilo de cadena lateral del aminoácido terminal Glu forma una amida con el grupo α-amino del residuo (está marcado con **).
c) Los grupos terminales amino y carboxilo se han modificado a grupos amida, y no tienen carga.

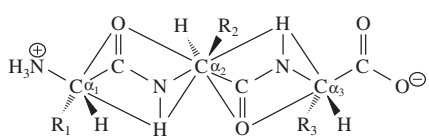


Glu His

17. a) L-Dopa está en la configuración *S*.
b) Los dos se derivan del aminoácido tirosina.

Capítulo 4
Proteínas: estructura tridimensional y función

1. a)



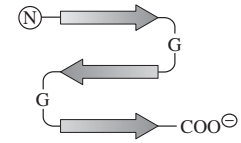
b) Los grupos R representan las cadenas laterales de residuos de aminoácido.
c) El carácter de doble enlace parcial de los enlaces amida C—N evita la rotación libre.
d) Los dos grupos péptido de este tripéptido tienen la conformación *trans*, porque los átomos de carbono α están en lados opuestos de los enlaces peptídicos.
e) Los grupos péptido pueden girar respecto de los enlaces $N—C_\alpha$ y $C_\alpha—C$.

2. a) 1) En la α hélice, se forman puentes de hidrógeno intracadena entre oxígenos carbonilo de ciertos residuos e hidrógenos de amida en otros residuos. Los puentes de hidrógeno son aproximadamente paralelos al eje de la hélice (figura 4.10).
2) En una triple hélice de colágena, los puentes de hidrógeno intercadena se forman entre los hidrógenos de amida de las glicinas en una cadena, y los átomos de oxígeno carbonilo de residuos (que con frecuencia son de prolina) en una cadena adyacente (figura 4.35). No hay puentes de hidrógeno intracadena en una hélice de colágena.
b) Las cadenas laterales de una α hélice apuntan hacia afuera, desde el cilindro de la hélice (figura 4.11). En la colágena, tres cadenas se enrollan entre sí de tal modo que cada tercer residuo de una cadena dada hace contacto con las otras dos cadenas, a lo largo del eje central de la triple hélice (figura 4.36). Sólo la pequeña cadena lateral de glicina puede caber en esas posiciones. Las demás cadenas laterales empujan hacia afuera desde la triple hélice enrollada.

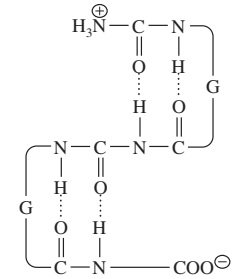
3. 1) La presencia de glicina en una α hélice desestabiliza la hélice, por la mayor libertad de movimiento permitida por la pequeña cadena lateral. Por esta razón, muchas α hélices comienzan y terminan con glicina.
2) La prolina tiende a interrumpir las α hélices, porque su cadena lateral, rígida y cíclica, interfiere estereoquímicamente con el espacio que ocuparía normalmente un residuo

vecino en la α hélice. Además, la prolina no tiene un hidrógeno en su nitrógeno amida y no puede participar en un puente de hidrógeno en el interior de la hélice.

4. a) Debido a la flexibilidad que resulta a partir de una pequeña cadena lateral (—H), con frecuencia se encuentra glicina en las "horquillas" que conectan secuencias de hebra β antiparalelas. Los residuos de glicina (G) en las posiciones 8 y 14 proporcionan dos regiones de horquilla para conectar las tres hebras β en la Betanova.



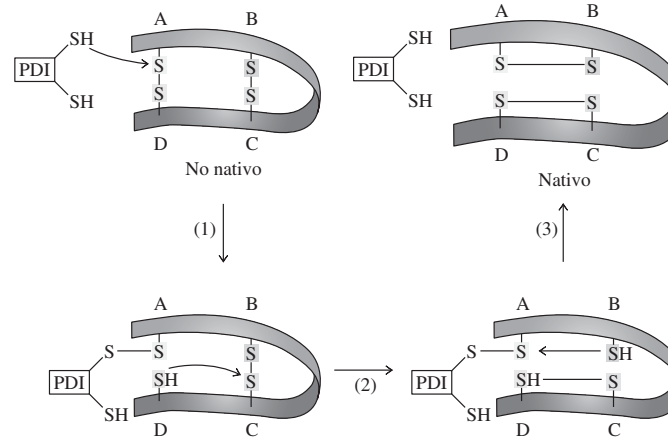
b) Las estructuras de lámina β-sheet se estabilizan con puentes de hidrógeno que se forman entre un oxígeno carbonilo de una hebra y un nitrógeno amida en una hebra adyacente (figura 4.15).



5. Motivo hélice-asa-hélice (HLH) (figura 4.19).

6. a) α/β. Regiones de α hélice y hebra β se alternan en la cadena de polipéptido.
b) Barril α/β. Las hebras β paralelas están rodeadas por una capa de α hélices en forma cilíndrica.
c) La FMN oxidorreductasa de levadura y la enzima de *E. coli* se requieren en la biosíntesis del triptófano (figura 4.24 i) y j), respectivamente).

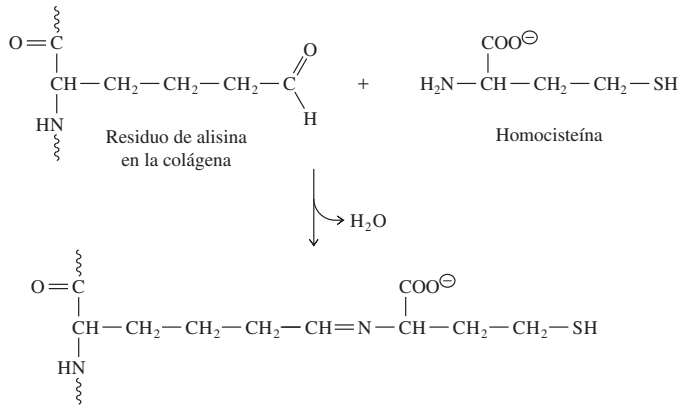
7. La proteína disulfuro isomerasa contiene dos residuos de cisteína reducida en el sitio activo, que participan en una reducción e intercambio de disulfuro que permite volver a doblarse a la proteína mal plegada y tener la conformación nativa de energía más baja.



8. Es más probable que las cadenas laterales muy hidrofóbicas de metionina, leucina, fenilalanina e isoleucina estén en el lado de la hélice que ve hacia el interior de la proteína. La mayor parte de las demás cadenas laterales son polares, o están cargadas, y pueden interactuar con el solvente acuoso. Como la α hélice es una estructura repetitiva con unos 3.6 residuos por vuelta, los grupos hidrofóbicos deben encontrarse cada tres o cuatro residuos a lo largo de la secuencia, así que un lado de la hélice es hidrofóbico.

9. Los enlaces covalentes cruzados contribuyen en forma importante a la resistencia y rigidez de las fibras de colágena. En un tipo de enlace cruzado, los residuos de lisina en una molécula de colágena se condensan con residuos de lisina en una molécula adya-

cente, y forman bases de Schiff (figura 4.38a). Cuando el residuo de alisina reacciona con homocisteína, no puede participar en los enlaces cruzados de moléculas de colágena. Es probable que altas concentraciones de homocisteína en la sangre causen estructura defectuosa de colágena y deformidades del esqueleto.



10. La secuencia –Gly–Pro–X–Y– se presenta con frecuencia en la colágena, que se encuentra en todo el organismo, incluyendo la piel. Como la enzima larvaria puede catalizar la ruptura de cadenas de colágena, el parásito puede entrar al huésped.

11. La reacción de dióxido de carbono con agua explica por qué hay disminución concomitante de pH cuando aumenta la concentración de CO_2. El dióxido de carbono producido por los tejidos de metabolismo rápido reacciona con agua para formar iones bicarbonato y $H^{\oplus}$.

a) $CO_2 + H_2O \longleftrightarrow H_2CO_3 \longleftrightarrow HCO_3^{\ominus} + H^{\oplus}$
El $H^{\oplus}$ generado en esta reacción disminuye el pH de la sangre, y estabiliza así la forma desoxi (conformación T) de la hemoglobina. El efecto neto es un aumento del P_{50}, esto es, una menor afinidad de la hemoglobina hacia el oxígeno, por lo que se libera más oxígeno a los tejidos (figura 4.50). El dióxido de carbono también baja la afinidad de la hemoglobina hacia el oxígeno porque forma aductos de carbamato con los *N*-terminal de las cuatro cadenas (figura 4.51). Esos aductos contribuyen a la estabilidad de la conformación desoxi (T) y aumentan así el P_{50} y promueven la liberación de oxígeno a los tejidos.

b) Las víctimas de choque sufren un déficit crítico de suministro de oxígeno a sus tejidos. El bicarbonato administrado por vía intravenosa es una fuente de dióxido de carbono a los tejidos. Al bajar la afinidad de la hemoglobina hacia el oxígeno, el dióxido de carbono facilita la liberación del oxígeno, de la oxihemoglobina a los ejidos.

12. a) 2.3BPG se une a cadenas laterales con carga positiva en la cavidad central de la desoxihemoglobina (figura 4.49). Como Hb F carece de dos grupos con carga positiva (His-143 de cada cadena β), 2.3BPG se une con menos fuerza a Hb F que a Hb A.

b) 2.3BPG estabiliza la forma desoxi de la hemoglobina y aumenta la fracción de moléculas en forma desoxi. Como Hb F se une a 2.3BPG con menos fuerza que Hb A, Hb F es menos afectado por 2.3BPG en la sangre, y tiene una fracción mayor de moléculas en forma oxi. En consecuencia, Hb F tiene mayor afinidad que Hb A hacia el oxígeno a cualquier presión de oxígeno.

c) A la presión de oxígeno que hay en los tejidos, de 20 a 40 torr, Hb F tiene mayor afinidad hacia el oxígeno que Hb A. La diferencia de afinidades permite la transferencia eficiente de oxígeno, de la sangre materna al feto.

13. El bajo valor de P_{50} de Hb_{Yakima} indica una afinidad mayor que la normal hacia el oxígeno, aun a la presión de oxígeno que se encuentran en los músculos en ejercicio. La mayor afinidad equivale a que Hb_{Yakima} cede menos oxígeno al músculo que se ejercita.

14. a) El enlace más efectivo de selenoproteína P a heparina se ve a un pH menor que 6. La unión de selenoproteína P a heparina disminuye a medida que aumenta el pH hasta 7. Hay muy poco enlace de selenoproteína P a heparina a valores de pH mayores que 7.

b) La heparina tiene carga negativa. Si la selenoproteína P tiene carga positiva, se puede unir a la heparina. Los residuos de histidina son abundantes en la selenoproteína P. La histidina tiene una cadena lateral de imidazol cuyo valor de pK_a es 6.0. Esto es, a un pH de 6.0, 50% de los residuos de histidina estarían protonados y tendrían carga positiva, y 50% no estarían protonados y sin carga. Abajo de un pH de 6.0, habría

una carga neta positiva en los residuos de histidina que causaría interacciones electrostáticas efectivas con la heparina. A valores de pH arriba de 7, casi todos los residuos de histidina estarían desprotonados y sin carga y no interactuarían en forma efectiva con la molécula de heparina, con carga negativa.

15. a) Los residuos hidrofílicos (en cursivas) y los residuos hidrofóbicos (subrayados) se identifican:
*E*CG*K*FMW*K*C*KNSND*CC*KD*LVC*SSR*W*K*WCVLA*S*PF

b) En la estructura tridimensional de las proteínas, los aminoácidos que están alejados entre sí en la secuencia primaria pueden interactuar en la estructura globular de la proteína. Así, los aminoácidos hidrofóbicos pueden estar muy cerca entre sí en la estructura tridimensional y presentar una cara "hidrofóbica" para interactuar con la membrana.

16. El reemplazo de lisina por metionina da como resultado una carga positiva menos en cada subunidad beta de la cavidad central (véase la figura 4.49). El 2,3BPG se une menos fuertemente a HbH. Eso hace que haya más proteína mutante en el estado R (se estabiliza la oxihemoglobina). La curva se corre hacia la izquierda (más como la mioglobina). Como hay más en el estado R, aumenta la afinidad hacia el oxígeno.

Capítulo 5
Propiedades de las enzimas

1. a) Cuando [S] $\gg$ K_m, $K_m + [S] \approx [S]$. La concentración del sustrato no tiene efecto sobre la velocidad, y $v_0 = V_{máx}$, como se ve en la parte superior de la curva en la figura 5.4a.

$$v_0 = \frac{V_{máx}[S]}{K_m + [S]} \approx \frac{V_{máx}[S]}{[S]} = V_{máx}$$

b) Cuando [S] $\ll$ Km, $K_m + [S] \approx K_m$, y la ecuación de Michaelis-Menten se simplifica a

$$v_0 = \frac{V_{máx}[S]}{K_m + [S]} \approx \frac{V_{máx}[S]}{K_m}$$

La velocidad se relaciona con [S] por un valor constante, y la reacción es de primer orden con respecto a S, como se ve en la parte inferior de la curva de la figura 5.4a.

c) Cuando $v_0 = V_{máx}/2$, $K_m = [S]$.

$$v_0 = \frac{V_{máx}}{2} = \frac{V_{máx}[S]}{K_m + [S]}$$

$$K_m + [S] = 2[S]$$

$$K_m = [S]$$

2. Las velocidades iniciales tienden a un valor constante a mayores concentraciones de sustrato, por lo que se puede estimar que la $V_{máx}$ es 70 mM/min. Como K_m es igual a la concentración de sustrato [S] requerida para llegar a la mitad de la velocidad máxima, se puede estimar que la K_m es 0.01 mM de acuerdo con el valor de la velocidad inicial de 35 mM/min.

3. a) La relación k_{cat}/K_m, o *constante de especificidad*, es una medida de la preferencia de una enzima hacia distintos sustratos. Cuando dos sustratos a la misma concentración compiten por el sitio activo de una enzima, la relación de sus velocidades de conversión a producto es igual a la relación de los valores de k_{cat}/K_m, ya que $v_0 = (k_{cat}/K_m)[E][S]$ para cada sustrato, y [E] y [S] son iguales.

$$\frac{v_0(S_1)}{v_0(S_2)} = \frac{(k_{cat}/K_m)^1/[E][S]}{(k_{cat}/K_m)^2/[E][S]}$$

b) El límite superior de k_{cat}/K_m tiende a 10^8 a 10^9 s^{-1}, la velocidad máxima a la que dos moléculas no cargadas se pueden acercar entre sí por difusión a temperaturas fisiológicas.

c) La eficiencia catalítica de una enzima no puede ser mayor que la tasa de formación de ES a partir de E y S. Las enzimas más eficientes tienen valores de K_{cat}/K_m que

tienden a la velocidad a la cual encuentran un sustrato, y a esa velocidad límite que tienen son los catalizadores más eficientes posibles.

4. La constante catalítica (k_{cat}) es la constante de velocidad de primer orden para la conversión de ES a E + P bajo concentraciones de sustrato saturadas (ecuación 5.26), y CA tiene mucho mayor actividad catalítica en la conversión de sustrato que OMPD. Sin embargo, la eficiencia de una enzima también se puede medir por la *aceleración de velocidad* que proporciona la enzima respecto de la reacción no catalizada correspondiente (k_{cat}/k_n, tabla 5.2). La reacción del sustrato para OMPD en ausencia de la enzima es muy lenta ($k_n = 3 \times 10^{-16}\ s^{-1}$) en comparación con la reacción del sustrato CA en ausencia de la enzima ($k_n = 1 \times 10^{-1}\ s^{-1}$). Por consiguiente, si bien la reacción con OMPD es mucho más lenta que la reacción con CA en términos de k_{cat}, la OMPD es una de las enzimas más eficientes que se conocen, y proporciona una aceleración de velocidad mucho mayor que CA, cuando se comparan las reacciones de cada enzima con las reacciones no catalizadas correspondientes.

5. Cuando [S] = 100 μM, [S] $\gg$ K_m, por lo que $v_0 = V_{máx} = 0.1\ \mu M\ min^{-1}$.

a) Para cualquier concentración de sustrato mayor que 100 μM, $v_0 = V_{máx} = 0.1\ \mu M\ min^{-1}$.

b) Cuando [S] = K_m, $v_0 = V_{máx}/2$, o $0.05\ \mu M\ min^{-1}$.

c) Como se conocen K_m y $V_{máx}$ se puede aplicar la ecuación de Michaelis-Menten para calcular v_0 a cualquier concentración de sustrato. Para [S] = 2 μM,

$$v_0 = \frac{V_{máx}[S]}{K_m + [S]} = \frac{(0.1\ \mu M\ min^{-1})(2\ \mu M)}{(1\ \mu M + 2\ \mu M)} = \frac{0.2}{3}\mu M\ min^{-1} = 0.067\ \mu M\ min^{-1}$$

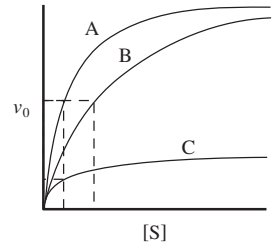
6. a) Se determina $[E]_{total}$ en moles por litro, y después se calcula $V_{máx}$.

$$[E]_{total} = 0.2\ g\ l^{-1}\left(\frac{1\ mol}{21\ 500\ g}\right) = 9.3 \times 10^{-6}\ M$$

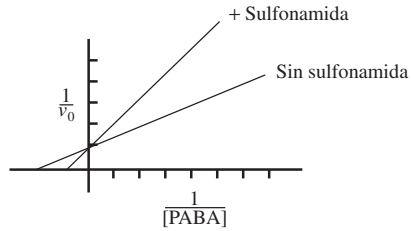
$$V_{máx} = k_{cat}[E]_{total} = 1000\ s^{-1}(9.3 \times 10^{-6}\ M) = 9.3 \times 10^{-3}\ M\ s^{-1}$$

b) Como $V_{máx}$ no cambia en presencia de un inhibidor, hay inhibición competitiva. Como el inhibidor se parece mucho al sustrato heptapéptido, es de esperar inhibición competitiva por unión al sitio activo de la enzima (es decir, inhibición competitiva clásica).

7. La curva A representa la reacción en ausencia de inhibidores. En presencia de un inhibidor competitivo (curva B), K_m aumenta y $V_{máx}$ no cambia. En presencia de un inhibidor no competitivo (curva C), $V_{máx}$ disminuye y K_m no cambia.

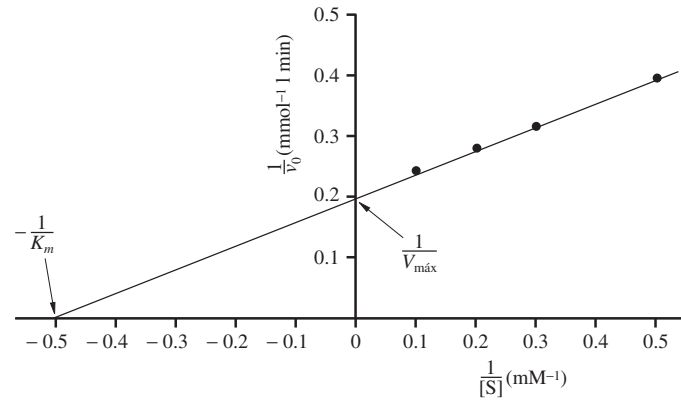


8. Como las sulfonamidas inhibidoras se parecen estructuralmente al sustrato PABA, se diría que las sulfonamidas se unen al sitio activo de la enzima en lugar del PABA y actúan como inhibidores competitivos (figura 5.9).



9. a) Para graficar los datos cinéticos de la fumarasa primero se calculan los recíprocos de las concentraciones de sustrato y de las velocidades iniciales de formación del producto. (Nótese la importancia de usar las unidades correctas para calcular y graficar los datos).

Fumarato	**Velocidad de formación de producto**		
[S] (mM)	$\frac{1}{[S]}$ **(mM^{-1})**	v_0 **(mmol l^{-1} min^{-1})**	$\frac{1}{v_0}$ **(mmol^{-1} l min)**
2.0	0.50	2.5	0.40
3.3	0.30	3.1	0.32
5.0	0.20	3.6	0.28
10.0	0.10	4.2	0.24



$V_{máx}$ se obtiene sacando recíproco de $1/V_{máx}$ a partir del intercepto y (figura 5.6).

$$1/V_{máx} = 0.20 \text{ mmol}^{-1} \text{ l min, entonces } V_{máx} = 5.0 \text{ mmol l}^{-1} \text{ min}^{-1}$$

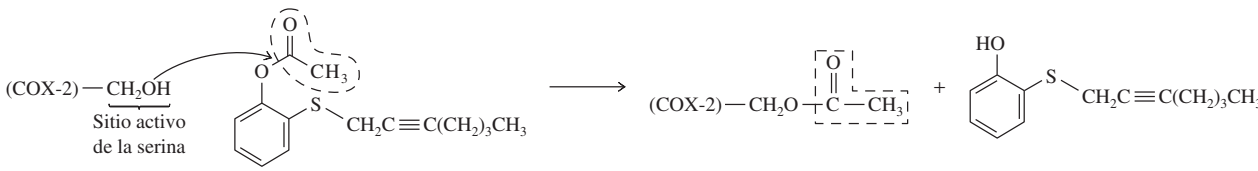
K_m se obtiene sacando el recíproco de $-1/K_m$ a partir del intercepto x

$$-1/K_m = -0.5 \text{ mM}^{-1}, \text{ entonces } K_m = 2.0 \text{ mM o } 2 \times 10^{-3} \text{ M}$$

b) El valor de k_{cat} representa la cantidad de reacciones por segundo que puede catalizar *un sitio activo.* Aunque la concentración de la enzima es 1×10^{-8} M, la fumarasa es un tetrámero con cuatro sitios activos por molécula, así que la concentración total de sitios activos de la enzima $[E_{total}]$ es 4×10^{-8} M. Se aplica la ecuación 5.26:

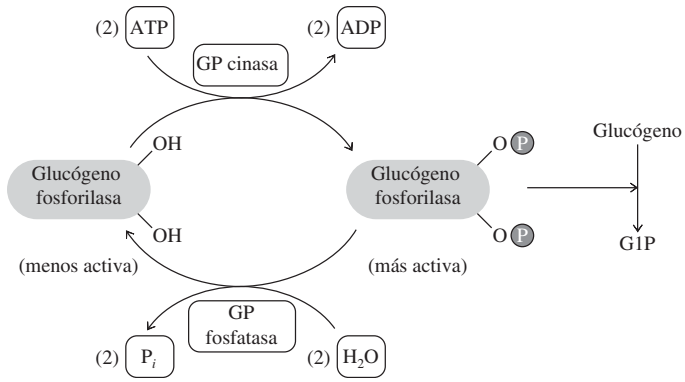
$$k_{cat} = \frac{V_{máx}}{[E_{total}]} = \frac{5.0 \text{ mmol l}^{-1} \text{ min}^{-1}}{4 \times 10^{-5} \text{ mmol l}^{-1}} \times \frac{1 \text{ min}}{60 \text{ s}} = 2 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$$

10. Tanto AHPS como la aspirina transfieren un grupo acetilo a un residuo de serina en enzimas COX. Como APHS es un inhibidor irreversible, no tiene cinética de inhibición competitiva, aun cuando actúa en el sitio activo de las enzimas COX.



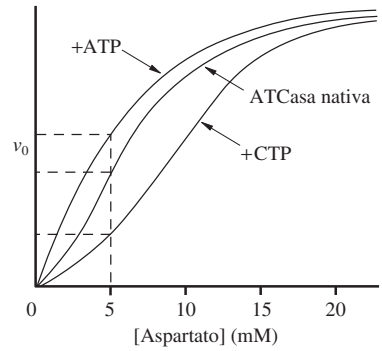
APHS Enzima inhibida irreversiblemente

11. Como la piruvato deshidrogenasa (PDH) (figura 5.25), la actividad de la glucógeno fosforilasa (GP) está regulada por la fosforilación alternada por una *cinasa*, y desfosforilación por una *fosfatasa*. Sin embargo, a diferencia de la PDH, la forma activa de la GP tiene dos residuos fosforilados de serina; en la forma inactiva de GP, no están fosforilados los dos residuos de serina.



12. La inhibición del primer paso comprometido en una ruta de varios pasos permite que la ruta sólo continúe cuando se necesita el producto final. Como el primer paso comprometido está regulado, no se acumulan productos intermedios. Este tipo de regulación conserva materias primas y energía.

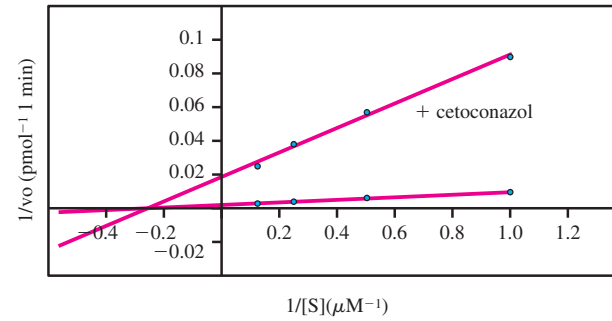
13. Cuando [aspartato] = 5 mM, $v_0 = V_{máx}/2$. Por consiguiente, en ausencia de moduladores alostéricos, K_m = [S] = 5 mM. El ATP aumenta la v_0, y el CTP disminuye la v_0.



14. La colágena es una proteína formada por tres cadenas de polipéptido enredadas entre sí formando una hélice triple. La proteasa bromelina es una enzima que rompe algunos de los enlaces peptídicos en las cadenas de polipéptido. Las cadenas de polipéptido son necesarias para retener a las moléculas de agua en estado semisólido cuando se enfría la gelatina; si se rompen, la gelatina no cuajará bien. La ruptura de las cadenas de polipéptido en la colágena por la bromelina destruye la capacidad de la gelatina para endurecerse. Si primero se cocina la piña, el calor desnaturalizará a la proteína y así se destruirá la actividad de la enzima. Por consiguiente, se puede agregar piña cocida a gelatina un poco cuajada y la gelatina llegará al estado semisólido, que es lo que se desea.

15. a) Para graficar los datos cinéticos para P450 3A4, se calculan primero los recíprocos de las concentraciones de sustrato y las velocidades iniciales de formación de producto. Los datos se grafican en el doble recíproco y se muestran con línea interrumpida.

Midazolam		**Velocidad de formación del producto**	
[S] (μM)	**1/[S] (μM^{-1})**	**v_0 (pmol l^{-1} min^{-1})**	**1/v_0 (pmol^{-1} l min)**
1	1	100	0.01
2	0.5	156	0.0064
4	0.25	222	0.0045
8	0.125	323	0.0031



$V_{máx}$ se obtiene sacando el recíproco de $1/V_{máx}$ a partir del intercepto y (figura 5.6).

$$1/\text{Vmáx} = 0.0025 \text{ pmol}^{-1} \text{ l min, y entonces Vmáx} = 400 \text{ pmol l}^{-1} \text{ min}^{-1}$$

K_m se obtiene sacando el recíproco de −1/Km a partir del intercepto x

$$-1/\text{Km} = -0.3\ \mu\text{M}^{-1}\text{, y entonces Km} = 3.3\ \mu\text{M}$$

b) Los recíprocos de la concentración del sustrato y la actividad en presencia de cetoconazol se ven en la tabla.

Midazolam [S] (μM)	**1/[S] (μM^{-1})**	**Velocidad de formación del producto en presencia de cetoconazol 0.1 μM v_0 (pmol l^{-1} min^{-1})**	**1/v_0 (pmol^{-1} l min)**
1	1	11	0.091
2	0.5	18	0.056
4	0.25	27	0.037
8	0.125	40	0.025

La gráfica de los datos (línea llena) se muestra en la gráfica doble recíproca en el punto a). Hay un incremento en el intercepto y sin cambio aparente en el intercepto x. Según la gráfica doble recíproca, parece que el cetoconazol es un inhibidor no competitivo (véase la figura 5.12). Esos inhibidores se caracterizan por una disminución aparente de $V_{más}$ (aumento en $1/V_{máx}$), sin que cambie K_m.

16. a) Parece que la bergamotina inhibe la actividad de P450 3A4, porque esa actividad, medida en presencia de bergamotina a 0.1 y 5 μM, es menor que la de P450 en ausencia de bergamotina.

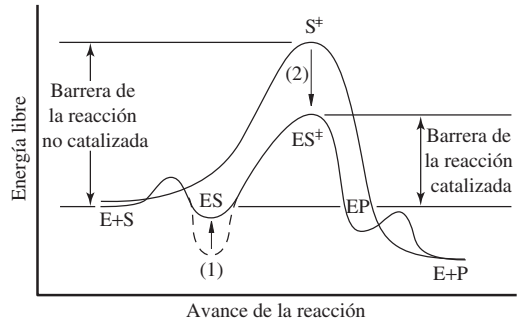
b) Podría resultar peligroso que un paciente tomara su medicina con jugo de uva, porque tal vez ocurra inhibición de la actividad de la P450 en presencia de bergamotina. Si la bergamotina disminuye la actividad de P450, y se sabe que la enzima P450 metaboliza el medicamento convirtiéndolo en una forma inactiva, puede ser que aumente el tiempo necesario para convertir la medicina en su forma inactiva. Eso puede prolongar los efectos del medicamento, que pueden causar consecuencias adversas para el paciente.

Capítulo 6
Mecanismos enzimáticos

1. a) Las principales fuerzas de enlace en los complejos ES incluyen interacciones entre cargas, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de van der Waals. (20% de las enzimas se unen a una molécula de sustrato o a parte de ella en forma covalente).

b) Una fuerte unión con un sustrato produciría un complejo ES que está en una trampa termodinámica, aumentando efectivamente la energía de activación, por lo que desacelera la reacción. Sin embargo, el enlace fuerte del estado de transición baja la energía del complejo ES‡, haciendo bajar así la energía de activación y aumentando la velocidad de reacción.

2. La barrera de activación para la reacción es baja debido a: 1) elevación de los niveles de la energía del estado basal (ES) y 2) disminución de los niveles de la energía del estado de transición ($ES^{\ddagger}$), lo que resulta en aumento de la velocidad de reacción.



3. El paso que determina la velocidad de una reacción de varios pasos es el paso más lento, que es el que tiene la mayor energía de activación. Para la reacción 1, el paso 2 es el que determina la velocidad. Para la reacción 2, el paso 1 es el que determina la velocidad.

4. Los grupos reactivos en la reacción 2 (—OH y —COOH) se mantienen en gran *proximidad*. Están orientados en forma adecuada para la catálisis, por agrupamiento estérico de los voluminosos grupos metilo del anillo. El grupo reactivo —COOH no puede girar y alejarse con tanta libertad como en la reacción 1. Los sistemas modelo como estos son importantes porque indican aumentos potenciales de la velocidad, que podrían obtenerse con enzimas que ponen a los sustratos y los grupos catalíticos de las enzimas en posiciones óptimas para la reacción.

5. a) Efecto de proximidad. La lisozima se une al sustrato tanto así que el enlace glicosídico que se va a romper está muy cerca de los grupos catalíticos de la enzima (Glu-35 y Asp-52).

b) Distorsión de sustrato. La energía del estado basal en el anillo de azúcar aumenta, porque se distorsiona en una conformación de media silla.

c) Catálisis ácido-base. Primero, el Glu-35 dona un protón a un oxígeno del azúcar saliente (catálisis ácida general) y después acepta un protón de la molécula de agua atacante (catálisis básica general).

d) Estabilización del estado de transición. El Asp-52 estabiliza la carga positiva que se está desarrollando en el oxocarbocatión intermedio, y el subsitio D favorece la conformación del azúcar en media silla de este compuesto intermedio. La estructura propuesta para el estado de transición incluye tanto su carga como la conformación del azúcar, y además los puentes de hidrógeno para varios residuos del sitio activo.

6. La serina 195 es el único residuo de serina en la enzima que participa en la tríada catalítica en el sitio activo de la α-chymotrypsin. El aumento resultante del carácter nucleofílico del oxígeno en la Ser-195 le permite reaccionar rápidamente con DFP.

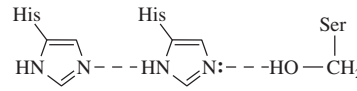
7. a) La tríada catalítica está formada por un residuo de aspartato, uno de histidina y uno de serina. La histidina actúa como catalizador general ácido-base, sacando a un protón de la serina para hacer que la serina sea un nucleófilo más potente en el paso inicial. El aspartato forma un puente de hidrógeno de barrera baja con la histidina, y estabiliza el estado de transición. Un catalizador ácido, la histidina, dona un protón para generar el grupo amino saliente.

b) El agujero oxianión contiene grupos —NH— de esqueleto que forman puentes de hidrógeno con el oxígeno con carga negativa en el intermedio tetraédrico. El agujero del oxianión media la estabilización del estado de transición, porque se une a ésta con más fuerza de la que se une al sustrato.

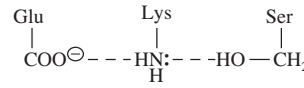
c) Durante la catálisis de tripsina, el aspartato forma un puente de hidrógeno de barrera baja con la forma imidazolio de la histidina. Como la asparagina carece de un grupo carboxilato que forme el puente de hidrógeno estabilizador con la histidina, la actividad enzimática disminuye en forma asombrosa.

8.

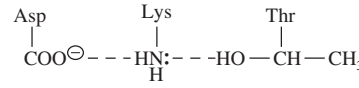
a) Proteasa de citomegalovirus humana: His, His, Ser



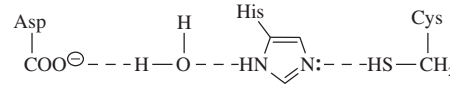
b) β-Lactamasa: Glu, Lys, Ser



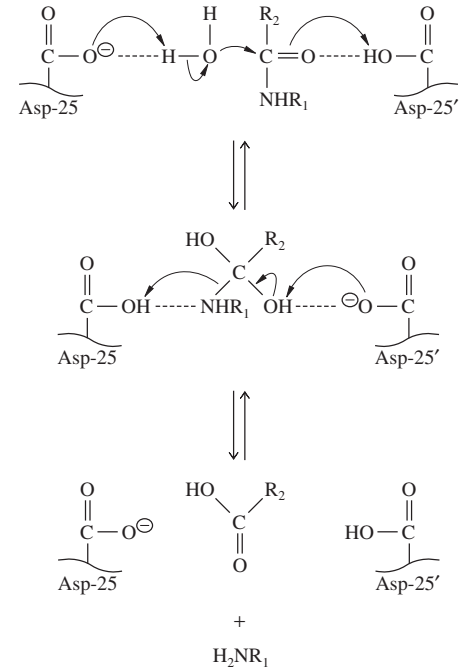
c) Asparaginasa: Asp, Lys, Thr



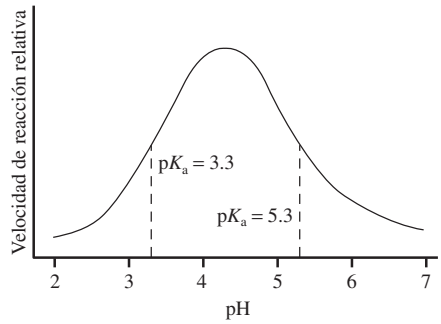
d) Proteasa de la Hepatitis A:



9. En el primer paso, Asp-25 reacciona como base, y Asp-25′ funciona como ácido. En el segundo paso se invierten los papeles de los dos residuos, y se forman los productos ácido y amino sin que haya un compuesto intermedio de enzima-sustrato.

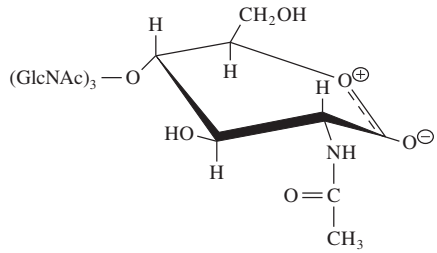


10. Se debe desprotonar el Asp-25 ($pK_a = 3.3$) ($RCOO^{\ominus}$) para actuar como base, en tanto que Asp-25′ ($pK_a = 5.3$) se debe protonar (RCOOH) para donar un protón a un grupo carbonilo peptídico. Los residuos de aspartato están principalmente en las formas correctas en la región de pH entre los dos valores de pK_a.



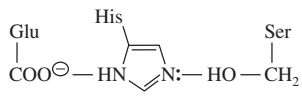
11. La invirasa se parece al intermedio tetraédrico en la hidrólisis de péptidos por HIV proteasa. Sin embargo, la invirasa posee un enlace C—C no hidrolizable en lugar del enlace peptídico C—N susceptible de una molécula de sustrato. Entonces, la invirasa actúa como un análogo al estado de transición y se une con mucho más fuerza al sitio activo que a un sustrato correspondiente.

12. El derivado es un análogo al estado de transición para la lisozima. La conformación del anillo de lactona en el inhibidor se parece a la conformación del residuo de azúcar en el sitio D de la lisozima. Además, la forma de resonancia del derivado es un ion oxonio con carga positiva, que es análogo al estado de transición de oxocarbocatión (abajo) que está estabilizado por el aspartato con carga negativa en el sitio activo.

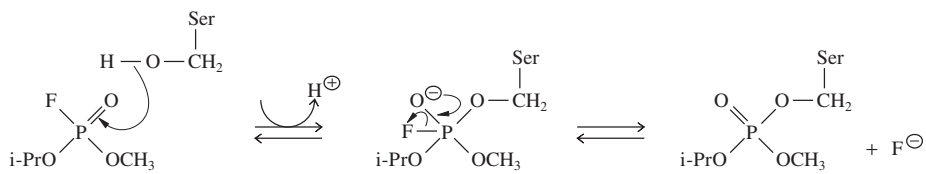


13. Cuando se mutó la tirosina a fenilalanina, la actividad de la enzima mutante era menos que 1% de la enzima de tipo silvestre. Entonces, el residuo de tirosina está implicado en la actividad catalítica de la DDP-IV. La tirosina contiene un grupo —OH en el anillo aromático de la cadena lateral. Como se indicó antes, esa tirosina se encuentra en el agujero del oxianión del sitio activo. Se sabe que los puentes de hidrógeno en el agujero del oxianión en las serina proteasas estabilizan al intermedio tetraédrico. La tirosina, con un grupo —OH en el puente de hidrógeno de la cadena lateral puede formar puente de hidrógeno y estabilizar al intermedio tetraédrico. La fenilalanina no tiene una cadena lateral que pueda formar puentes de hidrógeno. En consecuencia, el intermedio tetraédrico no se estabilizará, y causará una pérdida de actividad enzimática.

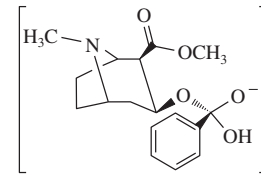
14. a) Tríada catalítica de acetilcolinesterasa: Glu-His-Ser



b)



15. Los análogos al estado de transición se unen a proteínas portadoras, y se usan como antígenos para inducir la formación de anticuerpos con actividad catalítica. La molécula tetraédrica del éster fosfonato es un análogo de la estructura intermedia tetraédrica en el estado de transición para la hidrólisis de la parte de éster bencílico en la cocaína. Un anticuerpo que se produce contra la estructura de fosfonato que debía estabilizar al estado de transición de la hidrólisis del éster bencílico de la cocaína podría catalizar bien esta reacción.



Estado de transición

16. a) El inhibidor de α1-proteinasa de tipo silvestre se administra como tratamiento para individuos que producen un inhibidor de α1-proteinasa con sustituciones en la secuencia de aminoácidos. Esos cambios causan la formación de una proteína que no inhibe bien a la proteasa elastasa. La actividad de elastasa sin control causa la descomposición de la elastina, que lleva a enfermedades pulmonares destructivas. Por consiguiente, a esos pacientes se les administra un inhibidor funcional de elastasa.

b) El tratamiento de la deficiencia de inhibidor α1-proteinasa es administrar por vía intravenosa la proteína de tipo silvestre. Si se administra por vía oral, las enzimas presentes en el tracto digestivo rompen los enlaces peptídicos en el inhibidor de α1-proteinasa. Si se administra el medicamento en forma directa al torrente sanguíneo, la proteína podrá circular a los pulmones y actuar en el sitio de la elastasa neutrófila.

Capítulo 7
Coenzimas y vitaminas

1. a) Oxidación: $NAD^{\oplus}$, FAD, o FMN. (La coenzima para la reacción que se muestra es $NAD^{\oplus}$).

b) Descarboxilación de un α-keto acid; pirofosfato de tiamina.

c) Reacción de carboxilación que requiere bicarbonato y ATP; biotina.

d) Rearreglo molecular; adenosilcobalamina.

e) Transferencia de un grupo hidroxietilo a partir de TPP a CoA como un grupo acilo; ácido lipoico.

2. a) $NAD^{\oplus}$, $NADP^{\oplus}$, FAD, FMN, lipoamida, ubiquinona. Coenzimas proteínas como tiorredoxina y los citocromos.

b) Coenzima A, lipoamida.

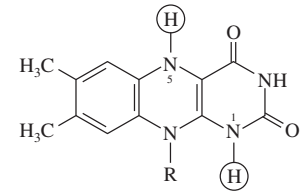
c) Tetrahidrofolato, *S*-adenosilmetionina, metilcobalamina.

d) Fosfato de piridoxal.

e) Biotina, pirofosfato de tiamina, vitamina K.

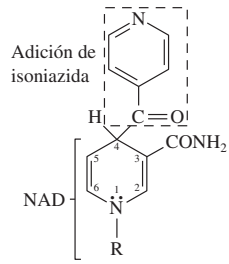
3. No. $NAD^{\oplus}$ requiere dos electrones pero sólo un protón. El segundo protón se libera en la solución y es utilizado por otras reacciones que requieran protones.

4.



5. $NAD^{\oplus}$, FAD y la coenzima A contienen un grupo ADP (o ADP con 3′-fosfato en la coenzima A).

6.



7. La vitamina B_6 se convierte en fosfato de piridoxal, que es la coenzima de una gran cantidad de reacciones donde intervienen aminoácidos, incluyendo las reacciones de descarboxilación en las rutas que producen serotonina y norepinefrina, a partir de triptófano y tirosina, respectivamente. Una insuficiencia de vitamina B_6 puede causar bajos niveles de PLP y disminución de la síntesis de neurotransmisores.

8. La vitamina K, que se requiere para la modificación de algunas de las proteínas que participan en la coagulación de la sangre.

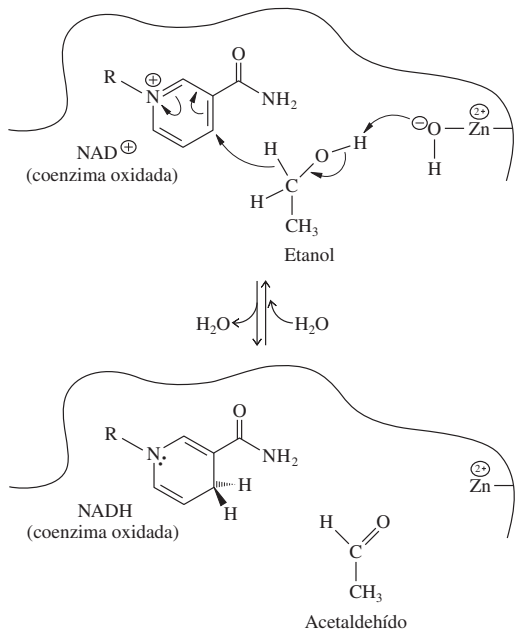
9. La síntesis de timidilato (dTMP) requiere un derivado de tetrahidrofolato (ácido fólico). La deficiencia de ácido fólico baja la cantidad de dTMP disponible para la síntesis de ADN. Si hay menos síntesis de ADN en los glóbulos rojos precursores, se produce menor división celular y se forman glóbulos rojos macrocíticos. La pérdida de células por ruptura causa anemia.

10. a) Cobalamina.

b) La adenosilcobalamina, derivada de la cobalamina, es una coenzima para el rearreglo intermolecular de metilmalonil-CoA para formar succinil-CoA (figura 7.25). Una deficiencia de adenosilcobalamina causa mayores concentraciones de metilmalonil-CoA y de ácido metilmalónico, su producto de hidrólisis. Otro derivado de la cobalamina, la metilcobalamina, es una coenzima para la síntesis de metionina a partir de homocisteína (ecuación 7.5) y una deficiencia de cobalamina causa exceso de homocisteína y deficiencia de metionina.

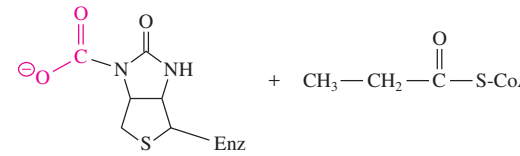
c) Las plantas no sintetizan cobalamina y en consecuencia no son fuente de esta vitamina.

11. a) En uno de los mecanismos propuestos, una molécula de agua unida al ion zinc de la alcohol deshidrogenasa forma OH^-, de la misma manera como el agua unida a anhidrasa carbónica (figura 7.2). El ion hidróxido, que es básico, sustrae al protón del grupo hidroxilo en el etanol, para formar H_2O. (En otro mecanismo se propone que el zinc también se une al oxígeno del alcohol en el etanol, y lo polariza).



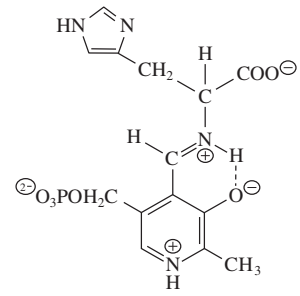
b) No, no se requiere un residuo como la arginina. El etanol, a diferencia del lactato, no tiene un grupo carboxilato que se pueda unir electrostáticamente a la cadena lateral de arginina.

12. Un grupo carboxilo se transfiere de la metilmalonil-CoA a la biotina, para formar carboxibiotina y propionil-CoA.



Carboxibiotina

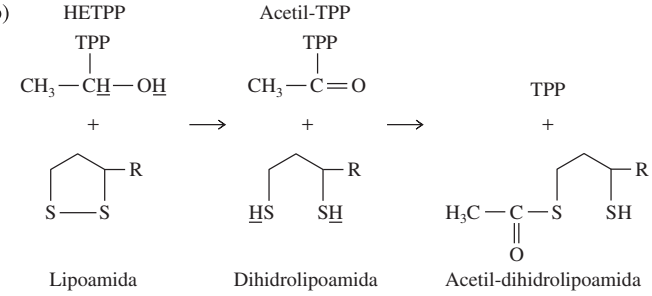
13. a)



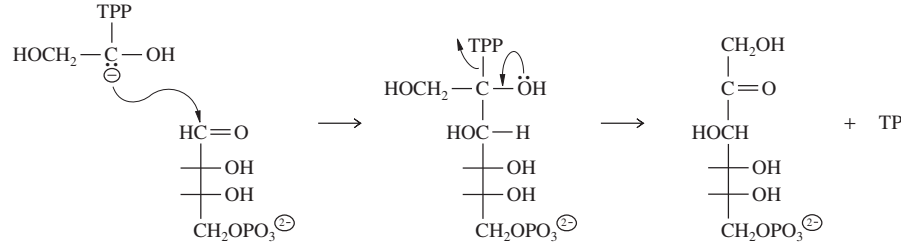
b) No habría racemización. Aunque se forma una base de Schiff durante la descarboxilación y la racemización, los grupos reactivos en el sitio activo de la histidina descarboxilasa catalizan en forma específica la descarboxilación, y no la racemización de la histidina.

14. a) Véanse las ecuaciones 13.2 a 13.4 en las páginas 386 y 387.

b)



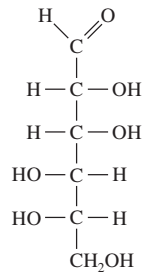
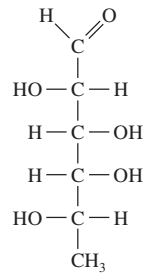
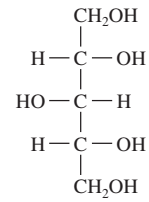
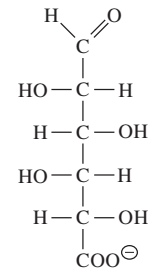
Lipoamida Dihidrolipoamida Acetil-dihidrolipoamida



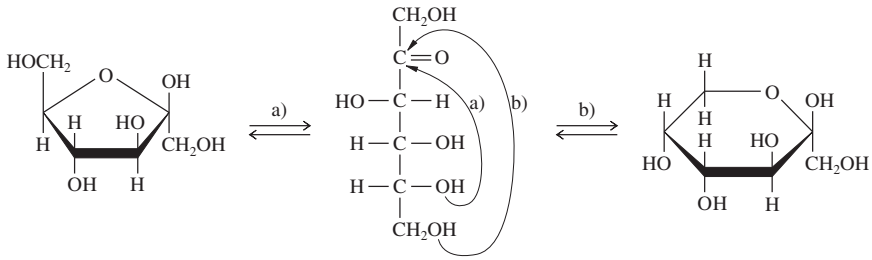
E-4-P F-6-P

Capítulo 8
Carbohidratos

1. a) D-Glucosa y D-manosa
b) L-Galactosa
c) D-Glucosa o D-talosa
d) Dihidroxiacetona
e) Eritrulosa (D o L)
f) D-Glucosa
g) *N*-Acetilglucosamina

2. a)  b)  c)  d) 

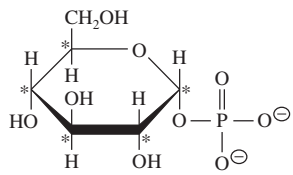
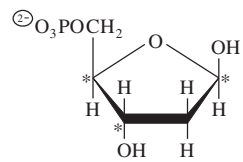
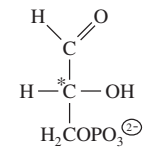
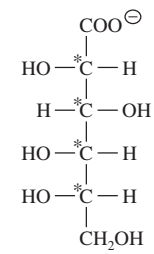
3. Los glucosaminoglicanos son heteroglicanos no ramificados de unidades repetitivas de disacáridos. Un componente del disacárido es un aminoazúcar y el otro suele ser un ácido aldurónico. En muchos glucosaminoglicanos, los grupos específicos hidróxilo y amino están sulfatados.

4. 

β-D-Fructofuranosa — D-Fructosa — β-D-Fructopiranosa

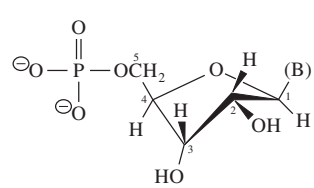
5. a) Anómero-α
b) Sí, va a mutorrotar
c) Sí, es un desoxiazúcar
d) Una cetona
e) Cuatro carbonos quirales

6. La glucopiranosa tiene cinco carbonos quirales y 2^5, o 32, estereoisómeros posibles; 16 son azúcares D y 16 son azúcares L. La fructofuranosa tiene cuatro carbonos quirales y 2^4, o 16, estereoisómeros posibles; 8 son azúcares D y 8 son azúcares L.

7. a)  b)  c)  d) 

8. Sólo las formas de cadena abierta de las aldosas tienen grupos aldehído libres que pueden formar bases de Schiff con grupos amino de proteínas. Como hay relativamente pocas moléculas de D-glucosa que estén en la forma de cadena abierta, es menos probable que la D-glucosa reaccione con las proteínas, en comparación con otras aldosas.

9. Una piranosa es más estable cuando los sustituyentes más voluminosos del anillo son ecuatoriales, y minimizan la repulsión estérica. En el confórmero más estable de la β-D-glucopiranosa, todos los grupos hidroxilo y el grupo —CH_2OH son ecuatoriales; en el confórmero más estable de la α-D-glucopiranosa, el grupo hidroxilo del C-1 es axial.

10. 

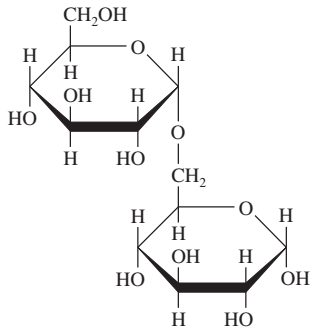
Conformación de sobre

11. Los anómeros α y β de la glucosa están en equilibrio rápido. Cuando se agota la β- D-glucosa por la reacción de glucosa oxidasa, se forma más anómero β a partir del anómero α hasta que se haya convertido toda la glucosa en gluconolactona.

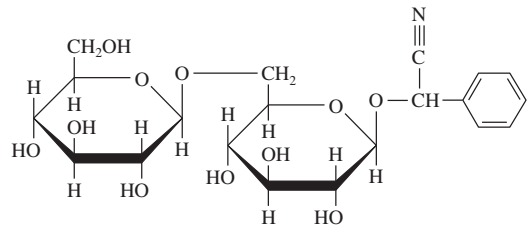
12. La sucralosa es un derivado del disacárido sacarosa (véase la figura 8.20). Los dos grupos hidroxilo en el C-1 y el C-6 de la molécula de fructosa se han sustituido con cloro. El grupo hidroxilo en el C-4 de la molécula de glucosa se eliminó, y después se agregó cloro. En la síntesis química de la sucralosa a partir del azúcar, se invierte la configuración del sustituyente en el C-4 de la parte de la glucosa.

13.

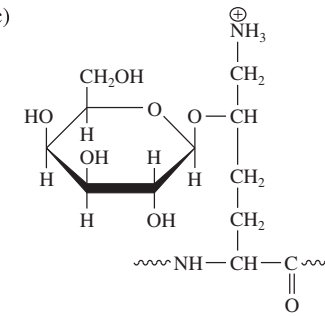
a)



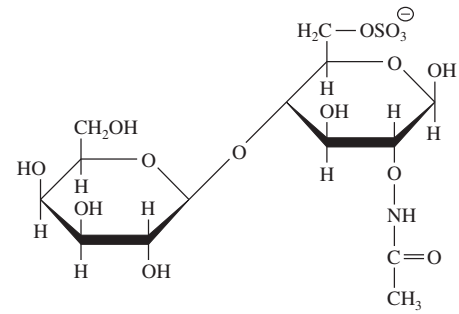
b)



c)

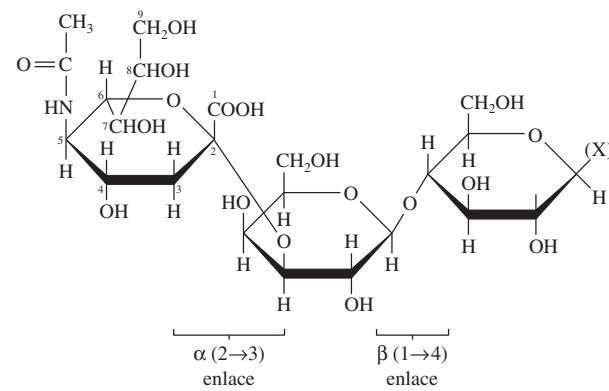


14.



15. a) a, b y c; esos oligosacáridos contienen enlaces GlcNAc — Asn.
b) b y c; esos oligosacáridos contienen enlaces β-galactosídicos.
c) b; este oligosacárido contiene ácido siálico.
d) Ninguno, porque ninguno de los oligosacáridos contiene fucosa.

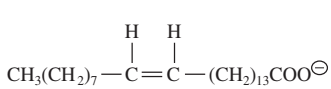
16.



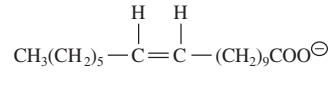
Capítulo 9
Lípidos y membranas

1.

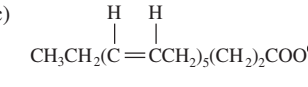
a)



b)



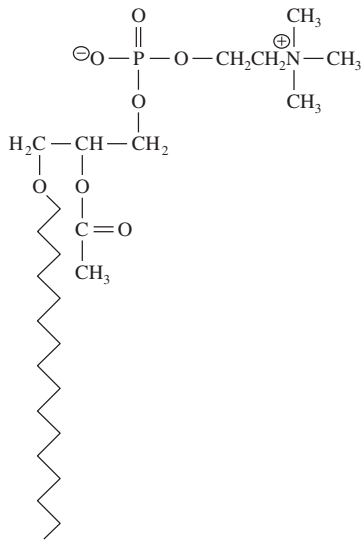
c)



2. a) $CH_3CH_2CH_2-O-(CH_2)_9COO^{\ominus}$ b) $CH_3(CHCH_2CH_2CH_2)_3CHCH_2COO^{\ominus}$ (CH₃ en cada CH) c) $CH_3(CH_2)_5CH-CH(CH_2)_9COO^{\ominus}$

3. a) ω-3; b) ω-6; c) ω-6; d) ninguno $(\omega\text{-}9)$; e) ω-6.

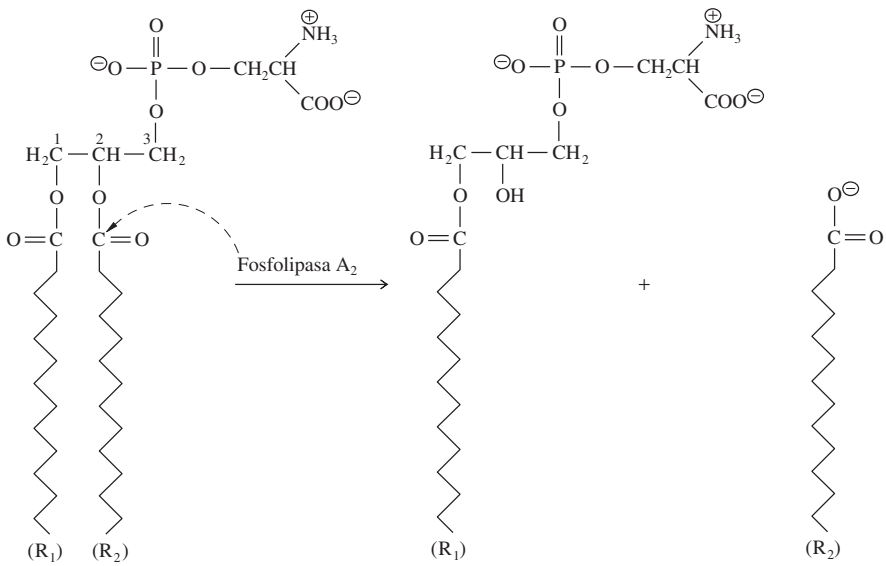
4.



5. a)

b) El ácido docosahexaenoico es clasificado como un ácido graso ω-3.

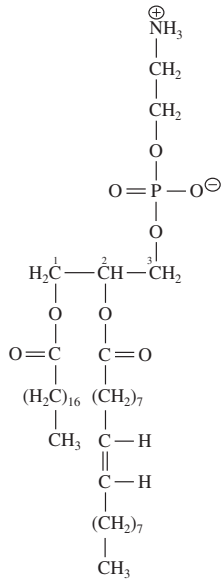
6.



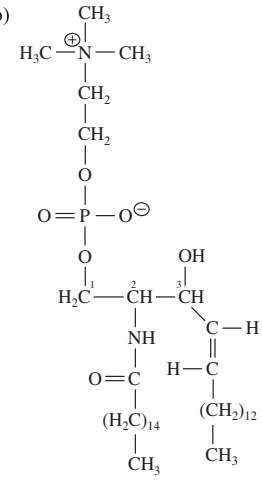
PS Una lisolecitina Ácido graso

7.

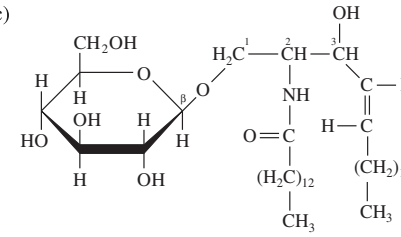
a)



b)

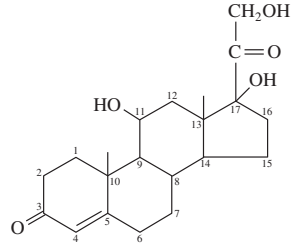


c)

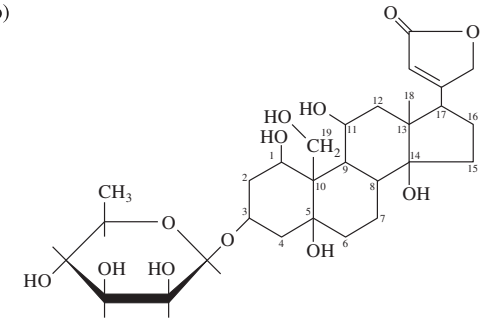


8.

a)



b)

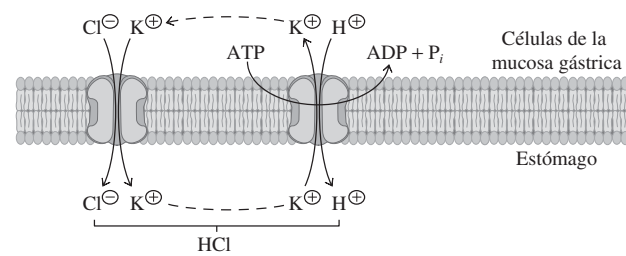


9. La PE contiene ácido docosahexaenoico en la posición C-2 del esqueleto de glicerol-3-fosfato en ambas temperaturas. A menores temperaturas, el porcentaje de los grupos acilo graso monoinsaturados en la posición C-1 aumentó de 14% a 30 °C, hasta 39% a 10 °C. Se debe mantener la fluidez de la membrana para el organismo, y eso se hace cambiando la composición de los lípidos de membrana. El aumento de lípidos no saturados a la temperatura menor permitirá una fluidez adecuada de la membrana.

10. La farnesil transferasa agrega un grupo farnesilo o "prenilo" a una cadena lateral de cisteína en la proteína *ras* (figura 9.29b). A continuación, la proteína *ras* se ancla a las membranas plasmática y del retículo endoplasmático, y está activa en los procesos celulares de señalización. La farnesil transferasa es un blanco de la quimioterapia, porque al inhibir esta enzima en las células tumorales se interrumpiría la actividad señalizadora de la proteína *ras* mutada. De hecho, los inhibidores de farnesil transferasa (FT) son supresores potentes de crecimiento tumoral en los ratones.

11. La línea A representa la difusión de glucosa a través de un canal o poro, y la línea B representa transporte pasivo. La difusión a través de un canal o poro en general no es saturable, y la velocidad aumenta en forma lineal con la concentración del soluto. El transporte por una proteína de transporte es saturable a altas concentraciones de soluto, en forma muy parecida a como se satura una enzima a altas concentraciones de sustrato (sección 9.11B).

12.



13. La teobromina se relaciona estructuralmente con la cafeína y la teofilina (figura 9.42). Las purinas metiladas, incluyendo obromina, inhiben la cAMP fosfodiesterasa, enzima soluble que cataliza la hidrólisis de cAMP a AMP (figura 9.40). Esas purinas metiladas inhiben la descomposición del mensajero intracelular cAMP, para formar AMP. En consecuencia, los efectos de cAMP son prolongados. Para los perros, eso se combina con que tienen eliminación más lenta de su sistema de la teobromina que ingieren. Ambas cosas producen la toxicidad asociada con la ingestión de chocolate.

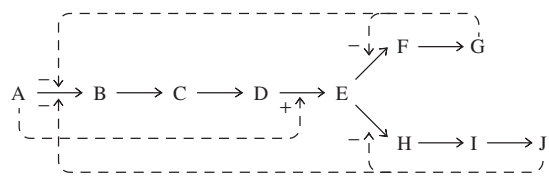
14. Los dos segundos mensajeros, IP_3 y DAG son complementarios, porque ambos promueven la actividad de las cinasas celulares, que a continuación activan proteínas blanco intracelulares porque causan su fosforilación. El diacilglicerol activa en forma directa a la proteína cinasa C, en tanto que IP_3 eleva las concentraciones de Ca^{2+} abriendo un canal de Ca^{2+} en la membrana del retículo endoplasmático, que libera el Ca^{2+} almacenado en el citosol (figura 9.45). Las mayores concentraciones de Ca^{2+} activan otro anillo de cinasa para la fosforilación y la activación de ciertas proteínas blanco

15. La insulina se puede seguir uniendo normalmente a las subunidades α del receptor de insulina, pero debido a la mutación, las subunidades β carecen de actividad de tirosina cinasa, y no pueden catalizar la autofosforilación ni otras reacciones de fosforilación. En consecuencia, la insulina no provoca una respuesta intracelular. La presencia de más insulina no tendrá mayor efecto.

16. Las proteínas G son interruptores moleculares con dos formas interconvertibles: una forma activa unida a GTP, y una forma inactiva unida a GDP (figura 9.39). En las proteínas G normales, la actividad de GTPasa convierte a la proteína activa G a la forma inactiva. Como la proteína *ras* carece de actividad GTPasa, no se puede inactivar. El resultado es la activación continua de adenilil ciclasa, y respuestas prolongadas a ciertas señales extracelulares.

Capítulo 10
Introducción al metabolismo

1. a)



b) La inhibición del primer paso en la ruta común, tanto por G como por J, evita la acumulación innecesaria de compuestos intermedios en la ruta. Cuando hay bastante G o J, menos moléculas de A entran a la ruta. Al regular una enzima después del punto de ramificación, G o J inhibe su propia producción, sin inhibir la producción del otro.

2. Al compartamentalizar los procesos metabólicos se permite tener concentraciones óptimas de sustratos y productos para cada ruta, en forma independiente en cada compartimiento. Además, la separación de enzimas de ruta también permite la regulación independiente de cada ruta sin interferencia por reguladores de la otra ruta.

3. En una ruta enzimática de varios pasos, el producto de una enzima será el sustrato de la siguiente en la ruta. Para las enzimas solubles independientes, el producto de cada enzima debe encontrar a la siguiente por difusión aleatoria en la solución. Al tener las enzimas secuenciales ubicadas cerca unas de otras, ya sea en un complejo multienzimático o en una membrana, el producto de cada enzima puede pasar en forma directa a la siguiente enzima, sin perder sustrato por difundirse en solución.

4. a) $\Delta G^{\circ\prime} = -RT \ln K_{eq}$

$$\ln K_{eq} = -\frac{\Delta G^{\circ\prime}}{RT} = -\frac{-9000 \text{ J mol}^{-1}}{(8.315 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1})(298 \text{ K})} = 3.63$$

$$K_{eq} = 38$$

b) $\Delta G^{\circ\prime} = -RT \ln K_{eq}$

$$K_{eq} = \frac{[\text{Glucosa}][P_i]}{[\text{Glucosa 6-P}][H_2O]} = \frac{(0.1 \text{ M})(0.1 \text{ M})}{(3.5 \times 10^{-5} \text{ M})(1)} = 286$$

$$\Delta G^{\circ\prime} = -(8.315 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1})(298 \text{ K}) \ln 286$$

$$\Delta G^{\circ\prime} = -14\,000 \text{ J mol}^{-1} = -14 \text{ kJ mol}^{-1}$$

5. a) $\Delta G = \Delta G^{\circ\prime} + RT \ln \dfrac{[\text{Arginina}][P_i]}{[\text{Fosfoarginina}][H_2O]}$

$$\Delta G = -32\,000 \text{ J mol}^{-1} + (8.315 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1})(298 \text{ K}) \ln \frac{(2.6 \times 10^{-3})(5 \times 10^{-3})}{(6.8 \times 10^{-3})(1)}$$

$$\Delta G = -48 \text{ kJ mol}^{-1}$$

b) $\Delta G^{\circ\prime}$ se define bajo las condiciones estándar de concentraciones de reactivos y productos 1M. (A la concentración de agua se le asigna un valor de 1). ΔG depende de las concentraciones reales de reactivos y productos.

c) Las moléculas con altas energías libres de hidrólisis, como fosfoarginina y acetil-CoA, son termodinámicamente inestables, pero pueden ser estables de manera cinética. Estas moléculas se hidrolizan con mucha lentitud en ausencia de un catalizador adecuado.

6.

	$\Delta G^{\circ\prime}$(kJ mol^{-1})
Glucosa 1-fosfato + UTP $\longrightarrow$ UDP-glucosa + PP_i	0
$PP_i + H_2O \longrightarrow 2\,P_i$	−29
	$\Delta G^{\circ\prime}$ −29

7. a) Aunque el ATP se utiliza rápidamente para fines energéticos, como contracción muscular y transporte por membrana, también se vuelve a sintetizar rápidamente a partir de ADP y P_i por rutas metabólicas intermedias. La energía para este proceso viene de la degradación de carbohidratos, grasas y aminoácidos, o de moléculas almacenadoras de energía, como fosfato de creatina muscular (CP + ADP $\rightarrow$ ATP + C). Con este reciclamiento rápido, 50 gramos totales de ATP y ADP son suficientes para satisfacer las necesidades de energía química del organismo.

b) El papel del ATP es el de transmisor de energía libre, más que de una molécula almacenadora de energía. Como se indicó en la parte a), el ATP no se almacena, sino que se utiliza con rapidez en reacciones que requieren energía.

8. $\Delta G^{\circ\prime}$ para la reacción de ATP y creatina se calcula como sigue:

	$\Delta G^{\circ\prime}$(kJ mol^{-1})
Creatina + $P_i \longleftrightarrow$ Fosfocreatina + H_2O	+43
ATP + $H_2O \longleftrightarrow$ ADP + P_i	−32
Creatina + ATP $\longleftrightarrow$ Fosfocreatina + ADP	+11

La relación de ATP entre ADP necesaria para mantener una relación de 20:1 entre fosfocreatina y creatina se calcula con la ecuación 10.13. En el equilibrio, $\Delta G = 0$, y entonces

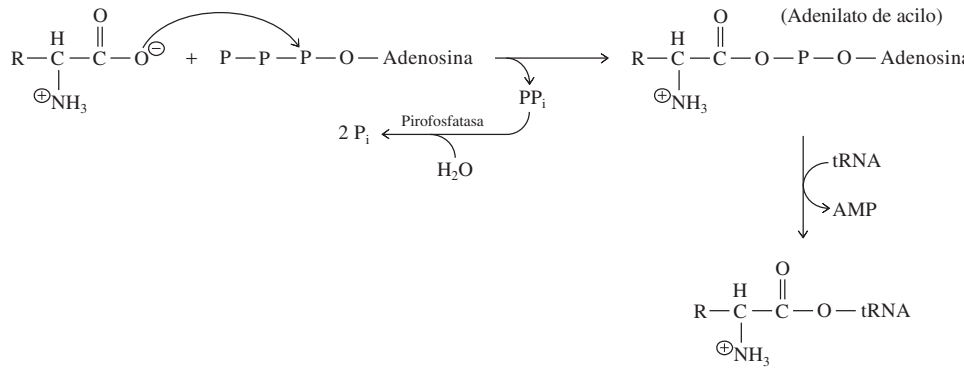
$$\Delta G^{\circ\prime} = -RT \ln \frac{[\text{Fosfocreatina}][\text{ADP}]}{[\text{Creatina}][\text{ATP}]}$$

$$\ln \frac{(20)[\text{ADP}]}{(1)[\text{ATP}]} = -\frac{\Delta G^{\circ\prime}}{RT} = -\frac{(11\,000 \text{ J mol}^{-1})}{(8.315 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1})(298 \text{ K})} = -4.44$$

$$\frac{(20)[\text{ADP}]}{(1)[\text{ATP}]} = 1.2 \times 10^{-2}$$

$$\frac{[\text{ATP}]}{[\text{ADP}]} = 1667 : 1$$

9.



10. $\Delta G^{\circ\prime} = -RT \ln K_{eq}$

$$K_{eq} = \frac{[\text{fructosa-6-fosfato}]}{[\text{glucosa-6-fosfato}]} = \frac{2}{1}$$

$$\Delta G^{\circ\prime} = -(8.315 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1})(298 \text{ K}) \ln 2$$

$$\Delta G^{\circ\prime} = -1.7 \text{ kJ mol}^{-1}$$

11. a) $$\ln K_{eq} = -\frac{\Delta G^{\circ\prime}}{RT} = -\frac{(25\,000 \text{ J mol}^{-1})}{(8.315 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1})(298 \text{ K})} = -10.1$$

$$K_{eq} = 4.1 \times 10^{-5}$$

b) $\Delta G^{\circ\prime}$ para la reacción acoplada es calculada como

	$\Delta G^{\circ\prime}$(kJ mol^{-1})
$A \longrightarrow B$	$+25$
$ATP + H_2O \longleftrightarrow ADP + P_i$	-32
$A + ATP + H_2O \longleftrightarrow B + ADP + P_i$	-7

$$\ln K_{eq} = -\frac{\Delta G^{\circ\prime}}{RT} = 2.8$$

$$K_{eq} = 17$$

K_{eq} para la reacción acoplada es unas 180 000 veces mayor que K_{eq} en la parte a).

c) $$K_{eq} = 17 = \frac{[\text{B}][\text{ADP}][\text{P}_i]}{[\text{A}][\text{ATP}][\text{H}_2\text{O}]} = \frac{[\text{B}][\text{ADP}]}{[\text{A}][\text{ATP}]} = \frac{[B](1)}{[\text{A}](400)}$$

$$\frac{[B]}{[\text{A}]} = 6800:1$$

Al acoplar la reacción de hidrólisis de ATP aumenta la relación de [B] entre [A] en un factor aproximado de 160 millones $(6800 \div (4.1 \times 10^{-5}) = 1.6 \times 10^{8})$.

12. Los electrones pasan de la molécula con potencial estándar de reducción más negativo a la molécula con potencial estándar de reducción más positivo.

a) Citocromo $b_5(Fe^{2+})$ + Citocromo $f(Fe^{3+}) \rightarrow$
Citocromo $b_5(Fe^{3+})$ + Citocromo $f(Fe^{2+})$

b) Succinato + Q $\rightarrow$ Fumarato + QH_2

c) Isocitrato + $NAD^{\oplus} \rightarrow$ α-Cetoglutarato + NADH

13. Los resultados esperados se ven en la gráfica de la derecha. A medida que se forma el NADH en la mezcla de reacción, aumentará la absorbencia a 340 nm (véase el recuadro 10.1).

14. Los potenciales estándares de reducción de la tabla 10.4 se refieren a semirreacciones que se escriben como $S_{ox} + n\,e^{\ominus} \rightarrow S_{red}$. Se pueden sumar dos semirreacciones para obtener la reacción acoplada de oxidación-reducción, invirtiendo la dirección de la semirreacción que tiene la especie reducida, e invirtiendo el signo de su potencial de reducción.

a)

	$E^{\circ\prime}$(V)
2 Cyt $c(Fe^{3+}) + 2e^{\ominus} \longrightarrow$ 2 Cyt $c(Fe^{2+})$	$+0.23$
$QH_2 \longrightarrow Q + 2\,H^{\oplus} + 2e^{\ominus}$	-0.04
2 Cyt $c(Fe^{3+}) + QH_2 \longrightarrow$ 2 Cyt $c(Fe^{2+}) + Q + 2\,H^{\oplus}$	$\Delta E^{\circ\prime} = 0.19$ V

$$\Delta G^{\circ\prime} = -nF\Delta E^{\circ\prime} = -(2)(96.48 \text{ kJ V}^{-1} \text{ mol}^{-1})(0.19 \text{ V})$$

$$\Delta G^{\circ\prime} = -37 \text{ kJ mol}^{-1}$$

b)

	E°(V)
$\frac{1}{2}O_2 + 2\,H^{\oplus} + 2\,e^{\ominus} \longrightarrow H_2O$	$+0.82$
Succinato $\longrightarrow$ Fumarato $2\,H^{\oplus} + 2\,e^{\ominus}$	-0.03
$\frac{1}{2}O_2$ + Succinato $\longrightarrow H_2O$ + Fumarato	$\Delta E^{\circ\prime} = 0.79$ V

$$\Delta G^{\circ\prime} = -(2)(96.48 \text{ kJ V}^{-1} \text{ mol}^{-1})(0.79 \text{ V})$$

$$\Delta G^{\circ\prime} = -150 \text{ kJ mol}^{-1}$$

15. La oxidación de NADH y la transferencia de electrones que resulta al O_2 por la cadena de transporte de electrones, suministra la energía libre acoplada a la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i (ecuaciones 10.30 a 10.34). Una citocromo oxidasa mutante con transporte deficiente de electrones podría disminuir la producción de ATP y afectar el metabolismo energético en el cerebro.

16. $Q + 2\,H^{\oplus} + 2\,e^{\ominus} \longrightarrow QH_2$ $\quad E^{\circ\prime}(V) = +0.04$

$FADH_2 \longrightarrow FAD + 2\,H^{\oplus} + 2\,e^{\ominus}$ $\quad +0.22$

$Q + FADH_2 \longrightarrow QH_2 + FAD$ $\quad \Delta E^{\circ\prime} = 0.26\ V$

$$\Delta E = \Delta E^{\circ\prime} - \frac{RT}{nF}\ln\frac{[QH_2][FAD]}{[Q][FADH_2]}$$

$$\Delta E = 0.26\ V - \frac{0.026\ V}{2}\ln\frac{(5\times10^{-5})(2\times10^{-4})}{(1\times10^{-4})(5\times10^{-3})}$$

$$\Delta E = 0.26\ V - 0.013(-3.9) = 0.31\ V$$

$$\Delta G = -nF\Delta E = -(2)(96.48\ kJ\ V^{-1}\ mol^{-1})(0.31\ V)$$

$$\Delta G = -60\ kJ\ mol^{-1}$$

Teóricamente, la oxidación de $FADH_2$ por ubiquinona libera más que suficiente energía libre para impulsar la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i.

Capítulo 11
Glicólisis

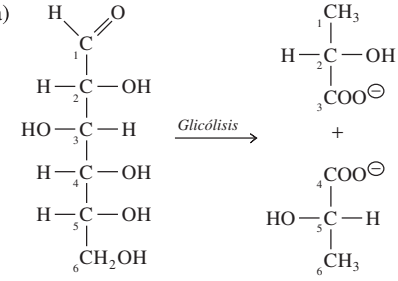
1. a) Véase la figura 11.2 y la ecuación 11.12.

b) 2 (se consumen 1 ATP en la reacción de fructocinasa, 1 ATP en la reacción de triosa cinasa y se generan 4 ATP por la etapa de triosas de la glicólisis).

c) 2 (2 ATP se consumen en la etapa de hexosa, y 4 ATP se generan en la etapa de triosa).

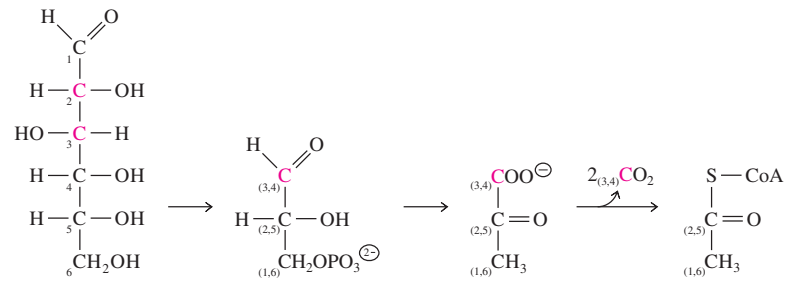
d) 5 (2 ATP se obtienen de fructosa, como en la parte b), y 3 ATP, no 2, se obtienen de la mitad de la glucosa, ya que se forma glucosa 1-fosfato, y no glucosa, cuando se rompe la sacarosa.

2. a)



Glucosa — 2 Lactato

b) La glucosa marcada en el C-3 o en el C-4 produce $^{14}CO_2$ por descarboxilación del piruvato.

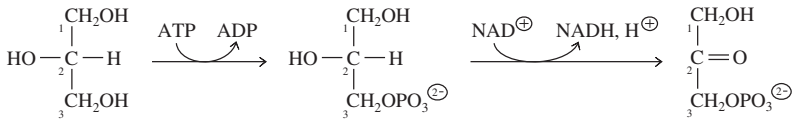


Glucosa — (2) Gliceraldehído 3-fosfato — (2) Piruvato — (2) Acetil-CoA

3. El fosfato inorgánico ($^{32}P_i$) se incorporará al 1,3-*bi*fosfoglicerato (1,3 BPG) en el carbono C-1 de la reacción de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH): gliceraldehído 3-fosfato + $NAD^{\oplus}$ + $P_i \rightarrow$ 1,3 BPG, y después se transfiere a la posición-γ del ATP en el siguiente paso: 1,3 BPG + ADP $\rightarrow$ ATP + 3-fosfoglicerato.

4. Como el cerebro cuenta casi únicamente de la glucosa para obtener energía, depende de la glicólisis como ruta principal para el catabolismo de glucosa. Ya que la proteína de Huntington se une fuertemente a GADPH, eso parece indicar que podría inhibir esa enzima glicolítica básica y con ello perjudicar la producción de ATP. Las menores concentraciones de ATP serían perjudiciales para las neuronas en el cerebro.

5. a)



Glicerol — L-Glicerol 3-fosfato — Dihidroxiacetona fosfato

b) Deben marcarse el C-2 y el C-3 del glicerol-3-fosfato. Una vez que el fosfato de dihidroxiacetona se convierte en gliceraldehído 3-fosfato, el C-1 se oxida y forma un aldehído, y después se pierde como CO_2 (problema 2).

6. La glucosa entra libremente al hígado por vía de las proteínas transportadoras GLUT2, y a continuación deben convertirse a glucosa 6-fosfato por acción de la glucocinasa, la isozima hexocinasa IV que predomina en el hígado. Como la glucocinasa tiene una K_m alta para la glucosa, tiene máxima actividad sólo a concentraciones elevadas de glucosa, y en consecuencia puede responder a aumentos de la glucosa sanguínea después de un alimento. La glucocinasa hepática participa en la regulación de las concentraciones de glucosa en la sangre al convertir la glucosa en glucosa 6-fosfato; las menores concentraciones de glucocinasa debidas a insulina insuficiente perjudicarían la utilización de la glucosa para la glicólisis o la síntesis de glucógeno en el hígado.

7. Las células que metabolizan glucosa para formar lactato por glicólisis anaeróbica producen mucho menos ATP por cada glucosa que las que la metabolizan aeróbicamente a CO_2 por glicólisis y el ciclo del ácido cítrico (figura 11.1). Se usará más glucosa por glicólisis anaeróbica para producir una cantidad suficiente de ATP para las necesidades celulares, y la tasa de conversión de glucosa a lactato es mucho mayor que bajo condiciones aeróbicas. Las células de cáncer en un ambiente anaeróbico toman más glucosa, y pueden producir mucho de algunas enzimas glicolíticas para compensar el aumento de actividad de esta ruta de metabolismo de carbohidratos.

8. No. La conversión de piruvato a lactato, catalizada por la lactato deshidrogenasa, oxida al NADH a $NAD^{\oplus}$, que se requiere para la reacción de la glicólisis de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

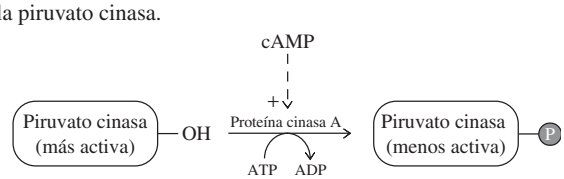
9. En las reacciones catalizadas por estas enzimas, el enlace entre el átomo de γ-fósforo y el oxígeno del grupo β-fósforilo se rompe cuando se transfiere el grupo γ-fosforilo del ATP (figura 11.3). El análogo no puede romperse en esta forma y en consecuencia inhibe las enzimas compitiendo con el ATP por el sitio reactivo.

10. El cambio de energía libre para la reacción de la aldolasa bajo condiciones estándar ($\Delta G^{\circ\prime}$) es +22.8 kJ mol^{-1}. Sin embargo, las concentraciones de fructosa 1,6 *bi*fosfato, dihidoxiacetona fosfato y gliceraldehído 3-fosfato en el músculo cardiaco son muy diferentes a las concentraciones supuestas de 1 M en las condiciones estándar. El cambio real de energía libre bajo las concentraciones celulares ($\Delta G^{\circ\prime} = -5.9$ kJ mol^{-1}) es muy distinta al $\Delta G^{\circ\prime}$, y la reacción de la aldolasa sólo se efectúa en la dirección necesaria para la glicólisis. Fructosa 1,6-*bi*fosfato → gliceraldehído 3-fosfato + dihidroxiacetona fosfato.

11. a) El ATP es a la vez un sustrato y un inhibidor alostérico para PFK-1. Mayores concentraciones de ATP dan como resultado una disminución de la actividad de la PFK-1 debido a un aumento en la K_m. El AMP es un activador alostérico que impide la inhibición causada por el ATP, y eleva así la curva cuando está presente AMP con ATP.

b) F2,6P es un activador alostérico de la PFK-1. En presencia de F2,6P, aumenta la actividad de la PFK-1 debido a que disminuye la K_m aparente para la fructosa 6-fosfato.

12. Una mayor [cAMP] activa a la proteína cinasa A, la cual cataliza la fosforilación e inactivación de la piruvato cinasa.



13. a) Una disminución de la glicólisis en el hígado permite que haya más glucosa disponible para exportar a otros tejidos.
b) Una menor actividad del sistema transductor de glucagon hace bajar la cantidad de cAMP que se forma. Al hidrolizarse el cAMP por la actividad de la fosfodiesterasa, la proteína cinasa A, dependiente de cAMP, se vuelve menos activa. Bajo estas condiciones, la actividad de la PFK-2 aumenta y disminuye la actividad de la fructosa 2,6-*bi*fosfatasa (figura 11.18). El aumento resultante de fructosa 2,6-*bi*fosfato activa la PFK-1, aumentando la velocidad general de la glicólisis. Una disminución de cAMP también causa la activación de la piruvato cinasa (problema 12).

Capítulo 12
Gluconeogénesis, la vía de las pentosas fosfato y el metabolismo del glucógeno

1. a) Después de agotarse el glucógeno durante el ayuno, al principio se usan lactato, glicerol y alanina como precursores para sintetizar glucosa. Cuando continúa el ayuno, las proteínas musculares se degradan a aminoácidos que se usan como precursores gluconeogénicos.
b) Un ejercicio intenso requiere grandes tasas de glicólisis anaeróbica en los músculos, lo cual produce grandes cantidades de lactato en la sangre. El lactato se absorbe en el hígado y se convierte en piruvato, que se usa en la síntesis de glucosa (ciclo de Cori, figura 12.2).

2. Se requiere poder reductor en forma de NADH (2), ATP (4) y GTP (2) para la síntesis de glucosa a partir de piruvato (ecuación 12.1). El NADH y el GTP son productos directos del ciclo del ácido cítrico, y el ATP se puede generar a partir de NADH y QH_2($FADH_2$) durante el proceso de fosforilación oxidativa.

3. La epinefrina interactúa con los receptores β-adrenérgicos en el hígado y activa la adenilil ciclasa, señalando la ruta que conduce a la producción de cAMP y la activación de la proteína cinasa A (figura 12.15). La proteína cinasa A activa la fosforilasa cinasa, lo cual a su vez activa a la glucógeno fosforilasa (GP) que produce la degradación del glucógeno (figura 12.16). Después la glucosa se puede transportar fuera del hígado, al torrente sanguíneo, donde es absorbida por los músculos para satisfacer la producción necesaria de energía.

$$\text{Hígado[Glucógeno} \xrightarrow{\text{(GP)}} \text{GIP} \longrightarrow \text{G6P} \longrightarrow \text{Glucosa]}$$
$$\longrightarrow \text{Torrente sanguíneo} \longrightarrow \text{Músculos}$$

4. a) La proteína fosfatasa-1 activada por insulina cataliza la hidrólisis de los enlaces éster de fosfato en la glucógeno sintasa (activándola), en la glucógeno fosforilasa y en la fosforilasa cinasa (inactivándolas), como se ve en la figura 12.17. Por consiguiente, la insulina estimula la síntesis de glucógeno e inhibe la degradación del glucógeno en las células musculares.
b) Sólo las células hepáticas son ricas en receptores de glucagon, por lo que el glucagon ejerce sus efectos en forma selectiva sobre las enzimas hepáticas.
c) El enlace de la glucosa al complejo glucógeno-fosforilasa-proteína fosfatasa-1 en las células hepáticas impide la inhibición de la proteína fosfatasa-1 y hace que la glucógeno fosforilasa sea más susceptible a la desfosforilación (inactivación) por la proteína fosfatasa-1 (figura 12.18). La proteína fosfatasa-1 también cataliza la desfosforilación de la glucógeno sintasa, activándola más. En consecuencia, la glucosa estimula la síntesis de glucógeno e inhibe la degradación de glucógeno en el hígado.

5. Menores concentraciones de fructosa 2,6-*bi*fosfato (F2,6BP) causan menor velocidad de glicólisis y mayor velocidad de gluconeogénesis. La F2,6BP es un activador de la enzima glicolítica fosfofructocinasa-1 (PFK-1) y bajas concentraciones de F2,6BP, dan como resultado menores velocidades de glicólisis. Además, la F2,6BP es un inhibidor de la enzima gluconeogénica fructosa 1,6-*bi*fosfatasa, por lo que menores concentraciones de F2,6BP harán bajar la inhibición y aumentarán la velocidad de gluconeogénesis (figura 12.4).

6. Cuando se une el glucagon a su receptor, activa a la adenilil ciclasa. La adenilil ciclasa cataliza la síntesis de cAMP a partir de ATP. El cAMP activa a la proteína cinasa A. La proteína cinasa A cataliza la fosforilación de PFK-2, que inactiva la actividad de la cinasa y activa la de fosfatasa. La fructosa 2,6-*bi*fosfatasa cataliza la desfosforilación hidrolítica de la fructosa 2,6-*bi*fosfatasa para formar fructosa 6-fosfato. La disminución que resulta en la concentración de fructosa 2,6-*bi*fosfato impide la inhibición de la fructosa 1,6-*bi*fosfatasa, y así activa la gluconeogénesis. Entonces disminuye la actividad de la PFK-2.

7. a) Sí. La síntesis de glucógeno a partir de glucosa 6-fosfato requiere la energía de un enlace fosfoanhídrido (en la hidrólisis de PP_i, figura 12.10). Sin embargo, cuando se degrada glucógeno a glucosa 6-fosfato, se usa fosfato inorgánico (P_i) en la reacción de fosforilación. No se usa algún enlace de fosfato de alta energía.

b) Hay una molécula menos de ATP disponible para usarse en los músculos cuando el glucógeno hepático es la fuente de la glucosa usada. El glucógeno hepático se degrada a glucosa fosfatos y después a glucosa, sin consumir ATP. Después del transporte a las células musculares, la glucosa se convierte en glucosa 6-fosfato por acción de la hexocinasa, en una reacción que consume una molécula de ATP. Sin embargo, el glucógeno muscular se convierte en forma directa en glucosa 1-fosfato por acción de la glucógeno fosforilasa, que no consume ATP. La glucosa 1-fosfato se isomeriza a glucosa 6-fosfato por acción de la fosfoglucomutasa.

8. Una deficiencia de glucógeno fosforilasa en los músculos evita la movilización de glucógeno a glucosa. Una glucosa insuficiente evita la producción de ATP por glicólisis. El ATP existente usado para la contracción muscular no se repone y así aumenta las concentraciones de ADP y de P_i. Como no hay glucosa disponible a partir de glucógeno en los músculos, no se produce lactato.

9. La conversión de glucosa 1-fosfato a dos moléculas de lactato produce tres equivalentes de ATP (1 ATP se gasta en la reacción de fosfofructocinasa-1, se producen 2 ATP en la reacción de fosfoglicerato cinasa, y se producen 2 ATP en la reacción de piruvato cinasa). Para convertir dos moléculas de lactato en una de glucosa 1-fosfato se requieren seis equivalentes de ATP (2 ATP en la reacción de piruvato carboxilasa, 2 GTP en la reacción de PEP carboxicinasa y 2 ATP en la reacción de fosfoglicerato cinasa).

10. a) El piruvato muscular de la glicólisis o del catabolismo de aminoácidos se convierte en alanina por transaminación. La alanina va al hígado, donde se vuelve a convertir a piruvato por transaminación con α-cetoglutarato. La gluconeogénesis convierte el piruvato a glucosa, que puede regresar a los músculos.

b) Se requiere NADH para reducir el piruvato a lactato en el ciclo de Cori, pero no se requiere para convertir piruvato en alanina en el ciclo de glucosa-alanina. Entonces, el ciclo de glucosa-alanina permite disponer de más NADH en los músculos para la producción de ATP por fosforilación oxidativa.

11. a) Una actividad inadecuada de glucosa 6-fosfatasa (G6P $\rightarrow$ glucosa + P_i) causa la acumulación de G6P intracelular, lo que inhibe a la glucógeno fosforilasa y activa a la glucógeno sintasa. Eso evita que se movilice el glucógeno hepático. Resultando en un aumento del glucogéno almacenado (y el agrandamiento del hígado), así como bajas concentraciones de glucosa en la sangre (hipoglucemia).

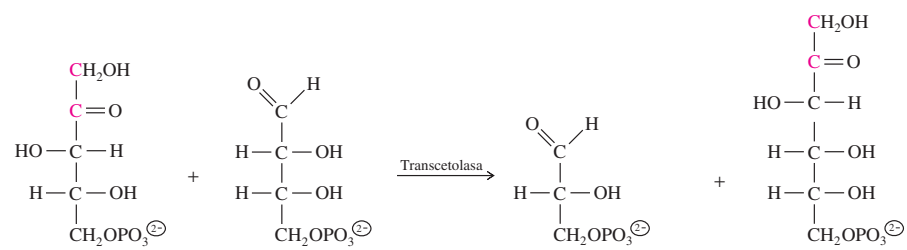
b) Sí. Una enzima ramificadora defectuosa causa acumulación de moléculas de glucógeno con ramas cortas defectuosas. Estas moléculas no se pueden degradar, por lo que habrá una degradación de glucógeno mucho menos eficiente para formación de glucosa. Las menores concentraciones sanguíneas de glucosa son resultado de la degradación defectuosa de glucógeno.

c) Una actividad deficiente de la fosforilasa hepática causa acumulación de glucógeno hepático, porque la enzima rompe una molécula de glucosa a partir del extremo no reductor de una cadena de glucógeno. Resultan menores las concentraciones de glucosa en la sangre, debido a la degradación defectuosa del glucógeno.

12. Glucosa 6-fosfato, gliceraldehído 3-fosfato y fructosa 6-fosfato.

13. La reparación de la lesión tisular requiere proliferación celular y síntesis de tejido cicatrizal. Se necesita NADPH para la síntesis de colesterol y ácidos grasos (componentes de las membranas celulares), y se necesita ribosa 5-fosfato para sintetizar ADN y ARN. Como la vía de las pentosas fosfato es la fuente principal de NADPH y de ribosa 5-fosfato, el tejido lesionado responde a mayores demandas de esos productos aumentando la tasa de síntesis de las enzimas de la ruta de las pentosas fosfato.

14. a)



Xilulosa 5-fosfato + Eritrosa 4-fosfato → Gliceraldehído 3-fosfato + Fructosa 6-fosfato

b) El C-2 de la glucosa 6-fosfato pasa a ser el C-1 de la xilulosa 5-fosfato. Después de que el C-1 y el C-2 de la xilulosa 5-fosfato se transfieren a la eritrosa 4-fosfato, la marca aparece en el C-1 de la fructosa 6-fosfato, como se vio en la parte a).

Capítulo 13
El ciclo del ácido cítrico

1. a) No es posible una síntesis neta, porque dos carbonos de la acetil-CoA entran al ciclo en la reacción de la citrato sintasa, y dos carbonos salen como CO_2 en las reacciones de isocitrato deshidrogenasa y α-cetoglutarato deshidrogenasa.

b) Se puede reponer el oxaloacetato por la reacción de piruvato carboxilasa, que efectúa una síntesis neta de OAA.

$$\text{Piruvato} + CO_2 + \text{ATP} + H_2O \longrightarrow \text{Oxaloacetato} + \text{ADP} + P_i$$

Esta es la principal reacción anaplerótica en algunos tejidos de mamíferos. Muchas plantas y algunas bacterias suministran oxaloacetato por vía de la reacción de fosfoenolpiruvato carboxicinasa.

$$\text{Fosfoenolpiruvato} + HCO_3^- \longrightarrow \text{Oxaloacetato} + P_i$$

2. La aconitasa se inhibiría por el fluorocitrato que se forma a partir de fluoroacetato, causando mayores concentraciones de ácido cítrico y menores concentraciones de los demás compuestos intermedios siguientes en el ciclo del ácido cítrico, desde isocitrato hasta oxaloacetato. Ya que el fluorocitrato es un inhibidor competitivo, concentraciones muy altas de citrato compensarían, al menos parcialmente, la inhibición de la aconitasa por fluorocitrato y permitirían continuar el ciclo hasta cierto nivel.

3. a) 12.5; 10.0 desde el ciclo y 2.5 desde la reacción de piruvato deshidrogenasa.

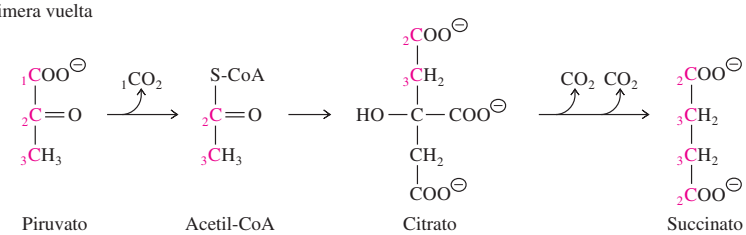
b) 10.0; 7.5 desde la oxidación de 3 NADH, 1.5 desde la oxidación de 1 QH_2 y 1.0 desde la fosforilación a nivel de sustrato, catalizada por Co Asintetasa.

4. 87.5% (28 de 32) del ATP se produce por fosforilación oxidativa y 12.5% (4 de 32) se produce por fosforilación a nivel sustrato.

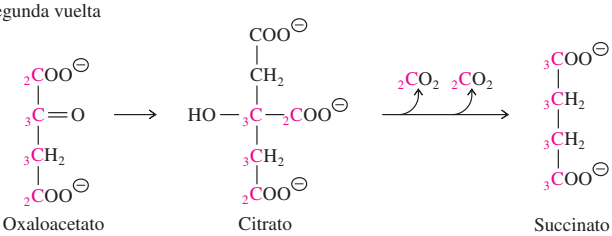
5. La tiamina es el precursor de la coenzima tiamina pirofosfato (TPP), que se encuentra en dos complejos enzimáticos asociados al ciclo del ácido cítrico: el complejo de piruvato deshidrogenasa y el complejo de α-cetoglutarato deshidrogenasa. Una deficiencia de TPP baja las actividades de esos complejos enzimáticos. Al bajar la conversión de piruvato a acetil-CoA y de α-cetoglutarato a succinil-CoA se produce acumulación de piruvato y de α-cetoglutarato.

6. Ya que el C-1 del piruvato se convierte en CO_2 en la reacción catalizada por el complejo de piruvato deshidrogenasa, el 1-[^{14}C]-piruvato es el primero en producir $^{14}CO_2$. Ninguno de los dos átomos de carbono del acetilo en la acetil-CoA se convierte en CO_2 durante la primera vuelta del ciclo del ácido cítrico (figura 12.5). Sin embargo, los átomos de carbono del carboxilato en el oxaloacetato, que vienen del C-2 del piruvato, se transforman en los dos carboxilatos del citrato que se eliminan como CO_2 durante una segunda vuelta del ciclo. Por consiguiente, el 2-[^{14}C]-piruvato es la segunda molécula marcada que produce $^{14}CO_2$. El 3-[^{14}C]-piruvato es el último en producir $^{14}CO_2$ en la tercera vuelta del ciclo.

Primera vuelta



Segunda vuelta



7. a) El NADH producido por las reacciones oxidativas del ciclo del ácido cítrico debe reciclarse a $NAD^{\oplus}$, que se requiere en la reacción de piruvato deshidrogenasa. Cuando las concentraciones de O_2 son bajas, se vuelven a oxidar menos moléculas de NADH con O_2 (por el proceso de fosforilación oxidativa), por lo que baja la actividad del complejo de piruvato deshidrogenasa.

b) La piruvato deshidrogenasa cinasa cataliza la fosforilación del complejo de piruvato deshidrogenasa inactivándola así (figura 13.12). Al inhibir la cinasa, el complejo de piruvato deshidrogenasa pasa a su forma más activa.

8. Una deficiencia de la enzima fumarasa en el ciclo del ácido cítrico causaría una concentración anormalmente alta de fumarato y de los compuestos intermedios anteriores en el ciclo, incluyendo succinato y α-cetoglutarato, lo cual causaría la excreción de esas moléculas.

9. Las dos diversas acciones de la acetil-CoA sobre dos componentes del complejo de piruvato deshidrogenasa (PDH) causan inhibición de la reacción de piruvato a acetil-CoA. La acetil-CoA inhibe al componente E_2 del complejo PDH en forma directa (figura 13.11). La acetil-CoA causa en forma indirecta la inhibición del componente E_1 activando el componente de piruvato cinasa (PK) del complejo PDH, y la PK fosforila al componente E_1 de la PDH, inactivándola (figura 13.12).

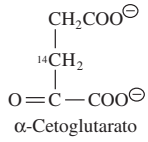
10. El complejo de piruvato deshidrogenasa cataliza la oxidación de piruvato para formar acetil-CoA y CO_2. Si hay actividad reducida de este complejo, aumentará la concentración de piruvato. El piruvato se convertirá en lactato por acción de la lactato deshidrogenasa. Se acumula lactato, porque aumenta el metabolismo glicolítico para sintetizar ATP, ya que se perjudica la oxidación de piruvato a acetil-CoA. Además, el piruvato se convierte en alanina, como se ve en la ecuación 12.6.

11. El calcio activa tanto a la isocitrato deshidrogenasa como a la α-cetoglutarato deshidrogenasa en el ciclo del ácido cítrico, y así aumenta este proceso catabólico y se produce más ATP. Además, el Ca^{2+} activa la enzima piruvato deshidrogenasa fosfatasa del complejo PDH, la que activa el componente E_1 (figura 13.12). La activación del complejo PDH convierte más piruvato en acetil-CoA para que entre al ciclo del ácido cítrico, y cause mayor producción de ATP.

12. a) La degradación de alanina reabastece a los compuestos intermedios en el ciclo del ácido cítrico, porque el piruvato se puede convertir en oxaloacetato por vía de la reacción de piruvato carboxilasa, la principal reacción anaplerótica en los mamíferos (ecuación 13.19). La degradación de la leucina no puede reponer los compuestos intermedios en el ciclo del ácido cítrico, porque por cada molécula de acetil-CoA que entra al ciclo, se pierden dos moléculas de CO_2.

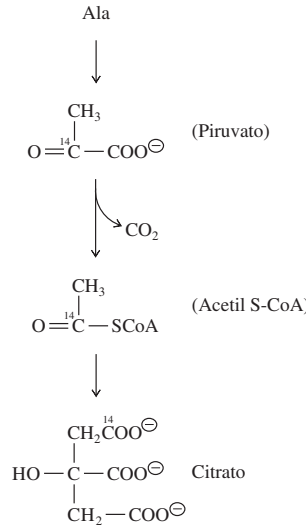
b) Al activar la piruvato carboxilasa, la acetil-CoA aumenta la cantidad de oxaloacetato producido directamente a partir de piruvato. El oxaloacetato puede reaccionar con la acetil-CoA producida por la degradación de ácidos grasos. El resultado es que aumenta el flujo del ciclo del ácido cítrico, para recuperar la energía almacenada en los ácidos grasos.

13. a)

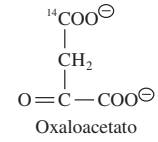


α-Cetoglutarato

b)



c)



Oxaloacetato

14. a) Dos moléculas de acetil-CoA producen 20 moléculas de ATP a través del ciclo del ácido cítrico (figura 13.10), o 6.5 moléculas de ATP a través del ciclo del glioxilato (de la oxidación de dos moléculas de NADH y una molécula de QH_2; reacción 13.22).

b) La función primaria del ciclo del ácido cítrico es oxidar acetil-CoA para proporcionar las coenzimas reducidas necesarias para generar moléculas ricas en energía, como ATP. La función primaria del ciclo del glioxilato no es producir ATP, sino convertir grupos acetilo en moléculas con cuatro carbonos que se puedan usar para producir glucosa.

15. La proteína que controla la actividad de la isocitrato deshidrogenasa en *E. coli* es una enzima bifuncional, con actividades de cinasa y fosfatasa, en la misma molécula de proteína. La actividad de cinasa fosforila la isocitrato deshidrogenasa para inhibir la actividad de isocitrato deshidrogenasa, y la actividad de fosfatasa desfosforila a la isocitrato deshidrogenasa para activar isocitrato deshidrogenasa. Cuando las concentraciones de compuestos intermedios glicolíticos y del ciclo del ácido cítrico son altas, la isocitrato deshidrogenasa no se fosforila, y está activa. Cuando la fosforilación disminuye la actividad de la isocitrato deshidrogenasa, el isocitrato se desvía al ciclo del glioxilato.

Capítulo 14
Transporte de electrones y síntesis de ATP

1. El potencial de reducción de un átomo de hierro en un grupo hemo depende del ambiente de proteínas que le rodea, que difiere para cada citocromo. Las diferencias de potenciales de reducción permiten que los electrones pasen por una serie de citocromos.

2. Vea la figura 14.6.

a) Complejo III. La ausencia de citocromo *c* evita que haya más flujo de electrones.

b) No hay reacción, porque falta el complejo I, que acepta electrones de NADH.

c) O_2.

d) Citocromo *c*. La ausencia del complejo IV evita que haya más flujo de electrones.

3. La UCP-2 permite el escape de protones de regreso a las mitocondrias, disminuyendo la fuerza protón motriz. El metabolismo de alimentos suministra la energía para el transporte de electrones, que a su vez crea el gradiente protón motriz que se usa para producir ATP. Un aumento de concentraciones de UCP-1 haría que el tejido tuviera menos eficiencia metabólica (es decir, se produciría menos ATP por gramo de alimento metabolizado). Como resultado, habría que metabolizar más carbohidratos, grasas y proteínas para satisfacer las necesidades metabólicas básicas, lo que "quemaría" más calorías, y potencialmente causaría pérdida de peso.

4. a) El demerol interactúa con el complejo I y evita la transferencia de electrones de NADH a Q. La concentración de NADH aumenta, porque no se puede volver a oxidar a $NAD^{\oplus}$. La concentración de Q aumenta, porque los electrones de la QH_2 se transfieren al O_2, pero no se reduce la Q de regreso a QH_2.

b) El mixotiazol inhibe la transferencia de electrones de QH_2 a citocromo c_1, y de QH_2 (por vía de $\cdot Q^-$) a citocromo b_{566} en el complejo III (figura 14.11). Las formas oxidadas de los dos citocromos predominan, porque el Fe^{3+} no se puede reducir por electrones desde la QH_2.

5. a) El oxígeno (O_2) se debe unir al Fe^{3+} del citocromo a_3 para aceptar electrones (figura 14.13) y no puede si el CN^- se une al átomo de hierro.

b) La metahemoglobina (Fe^{3+}) generada por tratamiento de nitrito compite con el citocromo a_3, por los iones CN^-. Esta competencia baja eficazmente la concentración de cianuro disponible para inhibir al citocromo a_3 en el complejo IV, y disminuye la inhibición de la cadena de transporte de electrones en presencia de CN^-.

6. Un sustrato suele oxidarse por un compuesto con un potencial de reducción más positivo. Ya que $E^{\circ\prime}$ para la actividad de ácido graso es cercano al $E^{\circ\prime}$ para FAD en el complejo II (0.0 V, como se ve en la tabla 14.1), la transferencia de electrones del ácido graso al FAD es favorable energéticamente.

$$\Delta E^{\circ\prime} = 0.0\ \text{V} - (-0.05\ \text{V}) = +0.05\ \text{V}$$
$$\Delta G^{\circ\prime} = -nF\Delta E^{\circ\prime}$$
$$\Delta G^{\circ\prime} = -(2)(96.48\ \text{kJ V}^{-1})(0.05\ \text{V}) = -9.6\ \text{kJ mol}^{-1}$$

Como el $E^{\circ\prime}$ para NADH en el complejo I es -0.32 V, es desfavorable la transferencia de electrones del ácido graso al NADH.

$$\Delta E^{\circ\prime} = -0.32\text{ V} - (-0.05\text{ V}) = -0.27\text{ V}$$

$$\Delta G^{\circ\prime} = -(2)(96.48\text{ kJ V}^{-1}\text{ mol}^{-1})(-0.27\text{ V}) = 52\text{ kJ mol}^{-1}$$

7. a) 10 protones; 2.5 ATP; P:O = 2.5.

b) 6 protones; 1.5 ATP; P:O = 1.5.

c) 2 protones; 0.5 ATP; P:O = 0.5.

8. a) La membrana mitocondrial interna tiene una carga neta positiva en el lado citosólico (exterior). El intercambio de un ATP^{4-} transferido hacia afuera, por un ADP^{3-} transferido hacia adentro, produce un movimiento neto de una carga negativa del lado de la matriz interna al lado citosólico. Así, el potencial de membrana asegura que el transporte hacia el exterior de un ATP con carga negativa sea favorecido por la carga positiva externa.

b) Sí. El potencial electroquímico con una carga positiva neta fuera de la membrana es resultado del bombeo de protones, el cual es impulsado por la cadena de transporte de electrones. Eso a su vez requiere la oxidación de metabolitos que generen NADH y QH_2 como donadores de electrones.

9. La síntesis de ATP se asocia normalmente con el transporte de electrones. A menos que el ADP pueda continuar ser traslocado al interior de la matriz mitocontrial para la síntesis de ATP, no ocurrirá la reacción y el gradiente de protones no se disipará. Se inhibirá el transporte de electrones a medida que aumente la concentración de protones en el espacio intermembrana.

10. a) En la lanzadera de malato-aspartato, la reducción de oxaloacetato en el citosol consume un protón que se libera en la matriz por oxidación de malato (figura 14.19). Por consiguiente, se aporta un protón menos al gradiente de concentración de protones por cada molécula de NADH citosólico oxidado (9 contra 10 para NADH mitocondrial). La producción de ATP a partir de dos moléculas de NADH citoplásmico es aproximadamente 4.5 y no 5.0.

b) *Reacciones citoplásmicas*

$$\text{Glucosa} \longrightarrow 2\text{ Piruvato} \qquad 2.0\text{ ATP}$$

$$2\text{ NADH} \longrightarrow 4.5\text{ ATP}$$

Mitochondrial reactions

$$2\text{ Piruvato} \longrightarrow 2\text{ Acetil}-\text{CoA} + 2\text{ CO}_2 \qquad 2\text{ NADH} \longrightarrow 5.0\text{ ATP}$$

$$2\text{ Acetil}-\text{CoA} \longrightarrow 4\text{ CO}_2 \qquad 2.0\text{ GTP}$$

$$6\text{ NADH} \longrightarrow 15.0\text{ ATP}$$

$$2\text{ QH}_2 \longrightarrow 3.0\text{ ATP}$$

$$\text{Total} \qquad 31.5\text{ ATP}$$

Capítulo 15
Fotosíntesis

1. Las clorofilas vegetales absorben energía en la región roja del espectro (figura 15.2). Los derivados de clorofila del pez dragón absorben energía de la luz roja (667 nm) y pasan las señales a los pigmentos visuales, en forma muy parecida a como las clorofilas antena vegetales, y las moléculas relacionadas, capturan la energía luminosa y la transfieren a un centro de reacción, donde los electrones suben a estados excitados para transferirse a aceptores en la cadena de transporte de electrones.

2. a) Rubisco es la proteína más abundante en el mundo, y el principal catalizador para la fotosíntesis; el medio básico por el que los organismos vivos adquieren el carbono necesario para su vida. Bien puede justificarse su importancia en el proceso de proporcionar alimento para todo ser vivo.

b) La fotorrespiración es un proceso que desperdicia ribulosa 1,5-*bi*fosfato, consume el NADPH y el ATP generados por las reacciones luminosas y puede reducir mucho los rendimientos de los cultivos. Hasta 20 a 30% del carbono fijado en la fotosíntesis

se puede perder en la fotorrespiración. Este proceso es consecuencia de la falta de especificidad de Rubisco, que puede usar O_2 en lugar de CO_2 (figura 15.8) para producir fosfoglicolato y 3-fosfoglicerato (figura 15.18) en lugar de dos moléculas de fosfato de triosa. Además, la Rubisco tiene baja actividad catalítica ($K_{cat} \approx 3\ s^{-1}$). Esta falta de especificidad y la baja actividad hace que la Rubisco sea merecedora del calificativo de enzima relativamente incompetente e ineficiente.

3. El O_2 se produce sólo durante las reacciones luminosas de la fotosíntesis, y los dos átomos de oxígeno proceden del H_2O (ecuación 15.4). Se pueden usar $H_2{}^{18}O$ o $C^{18}O_2$ marcados para seguir los destinos de determinados átomos de oxígeno.

$$CO_2 + 2\,H_2O^* \xrightarrow{\text{Luz}} (CH_2O) + O_2^* + H_2O$$

4. a) $CO_2 + 2\,H_2\,S \xrightarrow{\text{Luz}} (CH_2O) + H_2O + 2\,S$

$CO_2 + 2\,CH_3CH_2OH \xrightarrow{\text{Luz}} (CH_2O) + H_2O + 2\,CH_3CHO$

Etanol — Acetaldehído

b) Cuando el H_2O es el donador de protones, el producto es O_2, pero cuando se usan otros donadores de protones, como H_2S y etanol, no se puede producir oxígeno. La mayoría de las bacterias fotosintéticas no producen O_2 y son anaeróbicas obligadas, que se intoxican con O_2.

c) $CO_2 + 2\,H_2A \xrightarrow{\text{Luz}} (CH_2O) + H_2O + 2A$

5. Ya que la síntesis de gliceraldehído 3-fosfato a partir de CO_2 y H_2O es impulsada por los productos de las reacciones luminosas (reacción 15.5), los cloroplastos aislados no pueden sintetizar glucosa en la oscuridad. Cuando se adicionan los productos de las reacciones luminosas (NADPH y ATP), los cloroplastos pueden sintetizar glucosa en ausencia de la luz.

6. a) Dos moléculas de H_2O suministran el oxígeno para una de O_2 durante el proceso de fotosíntesis. Se debe eliminar un total de 4 electrones de 2 H_2O y pasarlos por un sistema de transporte de electrones a 2 NADPH. Se requiere un cuanto de luz para transferir un electrón a través de PSI y un cuanto para PSII. En consecuencia, se necesitará un total de 8 hν para hacer pasar a 4 electrones por ambos centros de reacción (4 hν para PHI y 4 hν para PHII).

b) Se requieren seis NADPH para la síntesis de un fosfato de triosa por el ciclo de Calvin (figura 15.19). Por consiguiente, se deben transferir 12 electrones a través de los dos centros de reacción del sistema de transporte de electrones, lo que requerirá la absorción de 24 hν.

7. a) Sí. (Vea el esquema Z, figura 15.12). Cuando el DCMU bloquea el flujo de electrones, el PSII en el estado $P680^*$ no se oxidará de regreso al estado $P680^{\oplus}$ que se requiere como aceptor de electrones del H_2O. Si el $P680^{\oplus}$ no oxida al H_2O, no se producirá O_2. En ausencia de flujo de electrones por el complejo de citocromo *bf*, no se traslocarán electrones a través de la membrana. Sin un gradiente de pH no será posible la fotofosforilación (síntesis de ATP).

b) Los aceptores externos de electrones para el PSII permitirán que el P680 se vuelva a oxidar a $P680^{\oplus}$ y restaurarán la evolución de O_2. Sin embargo, no pasarán electrones por el complejo de citocromo *bf*, así que no habrá fotofosforilación.

8. a) Cuando el pH externo sube a 8.0, el pH en el estroma aumenta también rápidamente, pero el pH luminal permanece bajo al principio, porque la membrana tilacoide es relativamente impermeable a los protones. El gradiente de pH a través de la membrana tilacoide impulsa la producción de ATP por traslocación de electrones a través de la ATP sintasa del cloroplasto (figura 15.16).

b) Los protones se transfieren del lumen al estroma por ATP sintasa, impulsando la síntesis de ATP. El gradiente de pH a través de la membrana disminuye, hasta que es insuficiente para impulsar la fosforilación del ADP y se detiene la síntesis del ATP.

9. Durante el transporte cíclico de electrones, la ferredoxina reducida dona sus electrones de regreso al par P700 por vía del complejo citocromo *bf* (figura 15.10). Al recorrer estos electrones el ciclo del fotosistema I, el gradiente de concentración de protones generado por el complejo de citocromo *bf* impulsa la síntesis del ATP. Sin embargo, no se produce NADPH, porque no hay flujo *neto* de electrones del H_2O a la ferredoxina. No

se produce O_2 porque el fotosistema II, sitio de producción de O_2, no interviene en el ciclo de transporte de electrones.

10. Los complejos de absorción de luz, la cadena de transporte de electrones y la cloroplasto ATP sintasa, todos residen en las membranas tilacoides, y la estructura e interacción de cualquiera de esos componentes fotosintéticos podría afectarse por un cambio en la naturaleza física de los lípidos de membrana.

11. El compuesto actúa como desacoplador. Hay transferencia de electrones sin síntesis de ATP. El compuesto destruye el gradiente de protones que se produce por transferencia de electrones.

12. a) La síntesis de una molécula de triosa fosfato a partir de CO_2 requiere nueve moléculas de ATP y seis moléculas de NADPH (ecuación 15.5). Como dos moléculas de triosa fosfato se pueden convertir en glucosa, en la síntesis de la glucosa se requieren 18 moléculas de ATP y 12 moléculas de NADPH.

b) Para incorporar glucosa 1-fosfato en el almidón se requiere un equivalente de ATP durante la conversión de glucosa 1-fosfato en ADP-glucosa (figura 15.24), y el requerimiento total se eleva a 19 moléculas de ATP y 12 moléculas de NADPH.

13. Véase la figura 15.19. a) C-1. b) C-3 y C-4. c) C-1 y C-2. El C-1 y el C-2 de la fructosa 6-fosfato se transfieren al gliceraldehído 3-fosfato para formar xilulosa 5-fosfato y el C-3 y el C-4 de la fructosa 6-fosfato se transforman en el C-1 y el C-2 de la eritrosa 4-fosfato.

14. a) En la ruta C_4 (figura 15.26), la reacción de piruvato-fosfato dicinasa consume dos equivalentes de ATP por cada CO_2 fijado (porque el PP_i se hidroliza a 2 P_i). Por consiguiente, las plantas con C_4 requieren 12 moléculas más de ATP por molécula de glucosa sintetizada que lo que requieren las plantas con C_3.

b) Como las plantas con C_4 minimizan la fotorrespiración, son más eficientes que las plantas con C_3 en el uso de energía luminosa para fijar CO_2 en carbohidratos, aun cuando las reacciones químicas para fijar CO_2 en las plantas con C_4 requieran más ATP.

15. a) Un aumento en el pH en el estroma aumenta la tasa del ciclo de Calvin de dos maneras.

1) Un aumento en el pH del estroma aumenta la actividad de la ribulosa 1,5-*bi*fosfato carboxilasa-oxigenasa (RuBisCo), la enzima reguladora central en el ciclo de Calvin, y también las actividades de la fructosa 1,6-*bi*fosfatasa y sedoheptulosa 1,7-*bi*fosfatasa. También aumenta la actividad de la fosforribulocinasa. La fosforribulocinasa es inhibida por el 3-fosfoglicerato (3PG) en el estado ionizado $3PG^{2-}$, pero no en el estado de ionización $3PG^{3-}$, que predomina a mayor pH.

2) Un aumento de pH del estroma también incrementa el gradiente de protones que impulsa la síntesis de ATP en los cloroplastos. Ya que las reacciones del ciclo de Calvin son impulsadas por ATP en los cloroplastos, un aumento en la producción de ATP eleva la tasa del ciclo de Calvin.

b) Una disminución en la concentración de Mg^{2+} del estroma hace bajar la tasa del ciclo de Calvin, disminuyendo la actividad de RuBisCo, fructosa 1,6-*bi*fosfatasa y sedoheptulosa 1,7-*bi*fosfatasa.

Capítulo 16
Metabolismo de lípidos

1. a) Las LDL son ricas en colesterol y en ésteres de colesterol, y transportan esos lípidos a los tejidos periféricos. La liberación de colesterol a los tejidos es moderada por receptores de LDL en las membranas celulares. Cuando los receptores de LDL son defectuosos, no hay absorción de colesterol mediada por receptor (sección 16.10B). Como no sale colesterol de la sangre, se acumula y contribuye a la formación de placas ateroscleróticas.

b) Las mayores concentraciones de colesterol por lo regular inhiben la transcripción de HMG-CoA reductasa y también estimulan la proteólisis de esta enzima. Si los LDL son defectuosos, continúa la síntesis de colesterol, sin importar la concentración de colesterol en la sangre, porque el colesterol extracelular no puede entrar a las células para regular la síntesis intracelular.

c) Las HDL sacan colesterol del plasma y de las células de los tejidos no hepáticos y lo transportan al hígado, donde se puede convertir en sales biliares para desecharlo. En los pacientes con enfermedad de Tangier, las HDL defectuosas, pobres en colesterol, no pueden absorber colesterol y se interrumpe el proceso normal de transporte al hígado.

2. a) Se requiere carnitina para el transporte de acil-CoA grasa para la β-oxidación en la matriz de la mitocondria (figura 16.21). La inhibición del transporte del ácido graso debida a la deficiencia de la carnitina disminuye la producción de energía proveniente de grasas para el trabajo muscular. El exceso de acil-CoA grasa puede convertirse en triglicéroles en las células musculares.

b) Como no se requiere la carnitina para transportar el piruvato, un producto de la glicólisis, para su oxidación en la mitocondria, no se afecta el metabolismo del glucógeno muscular en individuos con deficiencia de la carnitina.

3. a) La activacion del ácido graso C_{12} a acil-CoA grasa consume 2 ATP. Cinco vueltas de la β-oxidación generan 6 acetil-CoA, 5 QH_2 (que dan lugar a 7.5 ATP a través de la fosforilación oxidativa), y 5 NADH (que dan 12.5 ATP). La oxidación de las 6 acetil-CoA por el ciclo del ácido cítrico conduce a 60 ATP. Por lo tanto, la producción neta es de 78 equivalentes de ATP.

b) La activacion del ácido graso C_{16} monoinsaturado a acil-CoA grasa consume 2 ATP. Siete vueltas de la β-oxidación generan 8 acetil-CoA, 6 QH_2 (que producen 9 ATP por la fosforilación oxidativa) y 7 NADH (que dan 17.5 ATP). El ácido graso contiene un enlace doble *cis*-β,γ que se convierte a un enlace doble *trans*-α,β, por lo que la reacción de la acil-CoA catalizada por la deshidrogenasa, que genera QH_2, es desviada en la quinta vuelta. La oxidación de las 8 acetil-CoA por el ciclo del ácido cítrico da lugar a 80 ATP. Por ello, la producción neta es de 104.5 equivalentes de ATP.

4. Cuando se ingieren triacilgliceroles en la dieta, la hidrólisis de los lípidos de la dieta ocurre en particular en el intestino delgado. La lipasa pancreática cataliza la hidrólisis en las posiciones del C-1 y del C-3 del triacilglicerol, lo que produce ácidos grasos libres y 2-monoacilglicerol. Estas moléculas son transportadas al intestino en forma de micelas de sales biliares, donde son absorbidas por las células intestinales. Dentro de ellas, los ácidos grasos son convertidos en moléculas de acil-CoA grasa que por último forman triacilglicerol que es incorporado en quilomicrones para ser transportados a otros tejidos. Si la lipasa pancreática es inhibida, no podrán ser absorbidos los triglicéridos ingeridos de la dieta. Los triglicéridos serán llevados por el tracto digestivo y excretados sin ser absorbidos.

5. a) El oleato tiene un enlace doble *cis*-Δ^9 por lo que la oxidación requiere de la enoíl-CoA isomerasa (como en el paso 2 de la figura 16.23).

b) El araquidonato tiene enlaces dobles *cis*, tanto en carbonos nones (Δ^5, Δ^{11}) como en pares (Δ^8, Δ^{14}) por lo que la oxidación requiere de la enoíl-CoA isomerasa así como de la 2,4-dienoíl-CoA reductasa (como en el paso 5 de la figura 16.23).

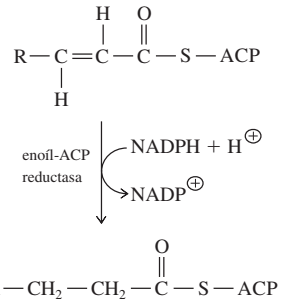
c) El ácido graso C_{17} contiene un enlace doble *cis* en el carbono par (Δ^6), por lo que la oxidación requiere de la 2,4-dienoíl-CoA reductasa. Además, se necesitan tres enzimas para convertir el producto propionil-CoA en succinil-CoA: propionil-CoA carboxilasa, metilmalonil-CoA racemasa y metilmalonil-CoA mutasa (figura 16.22).

6. Los ácidos grasos de cadena par son degradados a acetil-CoA, que no es un precursor gluconeogénico. La acetil-CoA no se convierte directamente a piruvato debido a que por cada dos carbonos de la acetil-CoA que entran al ciclo del ácido cítrico, dos carbonos en la forma de dos moléculas de CO_2 se liberan como productos. Por otra parte, los últimos tres carbonos de ácidos grasos de cadena impar producen una molécula de propionil-CoA sobre la degradación en la oxidación del ciclo de los ácidos grasos. La propionil-CoA puede ser carboxilada y convertida a succinil-CoA en tres pasos (figura 16.22). La succinil-CoA puede convertirse a oxaloacetato mediante enzimas del ciclo del ácido cítrico, y el oxaloacetato puede ser un precursor gluconeogénico para la síntesis de glucosa.

7. a) El carbono marcado permanece en $H^{14}CO_3^{\ominus}$; ninguno se incorpora en palmitato. Aunque $H^{14}CO_3^{\ominus}$ se incorpora en la malonil-CoA (figura 16.2), el mismo carbono se pierde como CO_2 durante la reacción de la cetoacil-ACP cintasa en *cada* vuelta del ciclo (figura 16.14).

b) Todos los carbonos pares se marcan. Excepto para la acetil-CoA que se convierte en palmitato C-15 y C-16, la acetil-CoA se transforma a malonil-CoA y luego a malonil-CoA-ACP antes de incorporarse a una cadena de ácido graso en crecimiento con la pérdida de CO_2.

8. a) La enoíl ACP reductasa cataliza el segundo paso de la reducción en la vía de la biosíntesis del ácido graso, lo que convierte una mitad trans-2,3 enoíl en una cadena acil saturada y utiliza NADPH como cofactor.

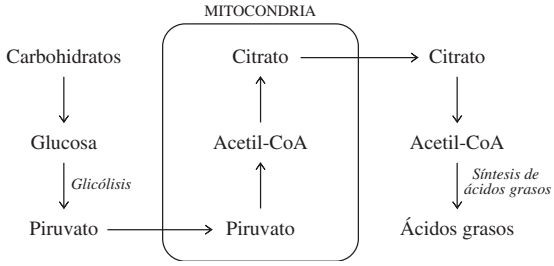


b) Los ácidos grasos son esenciales para las membranas en las bacterias. Si se inhibe la síntesis de ácidos grasos no habrá membranas nuevas y no crecerán las bacterias.

c) Los sistemas de la síntesis de los ácidos grasos son distintos en los animales que en las bacterias. Los animales tienen una síntesis de los ácidos grasos tipo I (FAS I), donde las diversas actividades enzimáticas se localizan en dominios individuales en una enzima multifuncional grande. En las bacterias, cada reacción de la síntesis de los ácidos grasos es catalizada por una enzima monofuncional separada. La comprensión de algunas de las diferencias en esos dos sistemas permitiría el diseño de inhibidores específicos del FAS II bacteriano.

9. El comer estimula la producción de la acetil-CoA a partir del metabolismo de los carbohidratos (glicólisis y piruvato deshidrogenasa) y de las grasas (oxidación de ácidos grasos). Normalmente, más acetil-CoA causa la elevación en la concentraciones del malonil-CoA (reacción de la acetil-CoA carboxilasa, figura 16.16), que puede actuar inhibiendo el apetito. Al bloquear la enzima ácido graso sintasa, el C75 evita la eliminación del malonil-CoA para la síntesis de los ácidos grasos, y eleva así las concentraciones del malonil-CoA reduciendo más el apetito.

10. a)



b) El NADH generado por la glicólisis se puede transformar en NADPH con una variedad de reacciones y rutas diferentes.

11. a) Las concentraciones abundantes de citrato y ATP favorecen la síntesis de los ácidos grasos. Las altas concentraciones de citrato activan a la ACC porque se une de preferencia y estabiliza la forma activa desfosforilada filamentosa. Por otra parte, las altas concentraciones de acil-CoA indican que no hay necesidad de más síntesis de ácido graso. La palmitoíl-CoA inactiva a la ACC uniéndose de preferencia a la forma desfosforilada inactiva protomérica.

b) El glucagon y la epinefrina inhiben la síntesis de los ácidos grasos, porque inhiben la actividad de la acetil-CoA carboxilasa. Ambas hormonas se unen a receptores celulares y activan la síntesis de cAMP, que a su vez activa a las proteínas cinasas. La fosforilación de la ACC por las proteínas cinasas la convierte en la forma inactiva e inhibe así la síntesis de los ácidos grasos. Por otra parte, las proteínas cinasas activas catalizan la fosforilación y la activación de las triacilglicerol lipasas que catalizan la hidrólisis de los triacilgliceroles, liberando ácidos grasos para la β-oxidación.

12. a) Un inhibidor de la acetil-CoA acetilasa afectará una reacción amortiguadora clave en la síntesis de los ácidos grasos. La concentración de malonil-CoA, producto de la reacción de acetil-CoA catalizada por una carboxilasa bajará en presencia del inhibidor. La disminución de la concentración de malonil-CoA impedirá la inhibición de la carnitina aciltransferasa I, que es un sitio regulador clave para la oxidación de los ácidos grasos. Así, con un sistema de transportador activo, los ácidos grasos se traslocarán a la matriz mitocondrial, donde suceden las reacciones de la β-oxidación. En presencia de un inhibidor de la acetil-CoA carboxilasa, la síntesis de los ácidos grasos disminuirá y aumentará la β-oxidación.

b) CABI es un análogo estructural de la biotina. La acetil-CoA carboxilasa es una enzima dependiente de la biotina. Un análogo de la biotina puede tomar el lugar de ésta e inhibir la actividad de la acetil-CoA carboxilasa.

13. La reacción total para la síntesis del palmitato a partir de la acetil-CoA es la suma de dos procesos: 1) la formación de siete malonil-CoA por la acción de la acetil-CoA carboxilasa y 2) siete ciclos de la ruta de la biosíntesis de los ácidos grasos.

$$7\ \text{Acetil CoA} + 7\ CO_2 + 7\ \text{ATP} \longrightarrow 7\ \text{Malonil CoA} + 7\ \text{ADP} + 7\ P_i$$
$$\text{Acetil CoA} + 7\ \text{Malonil CoA} + 14\ \text{NADPH} + 14\ H^{\oplus} \longrightarrow \text{Palmitato} + 7\ CO_2 + 14\ \text{NADP}^{\oplus} + 8\ \text{HS} - \text{CoA} + 6\ H_2O$$

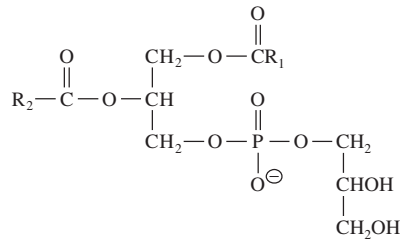
$$8\ \text{Acetil CoA} + 7\ \text{ATP} + 14\ \text{NADPH} + 14\ H^{\oplus} \longrightarrow \text{Palmitato} + 7\ \text{ADP} + 7\ P_i + 14\ \text{NADP}^{\oplus} + 8\ \text{HS} - \text{CoA} + 6\ H_2O$$

14. a) El ácido araquidónico es el precursor para la síntesis de los eicosanoides, incluyendo "reguladores locales" como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (figura 16.12). Esos reguladores intervienen en la mediación de las respuestas al dolor, inflamación e hinchazones que resultan en los tejidos lesionados.

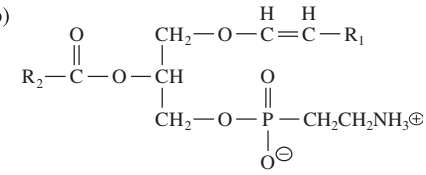
b) Tanto las prostaglandinas como los leucotrienos se derivan del araquidonato, que se libera de los fosfolípidos de membrana por acción de las fosfolipasas. Al inhibir una fosfolipasa, los medicamentos esteroideos bloquean la biosíntesis, *tanto* de las prostaglandinas *como* de los leucotrienos. Los medicamentos semejantes a la aspirina bloquean la conversión del araquidonato en precursores de las prostaglandina, inhibiendo la ciclooxigenasa, pero no afectan la síntesis del leucotrieno.

15.

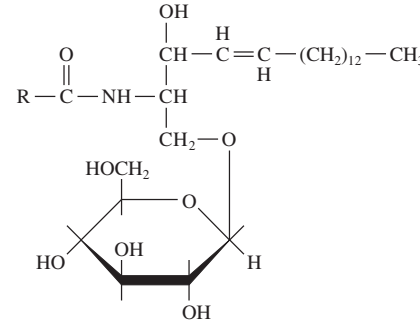
a)



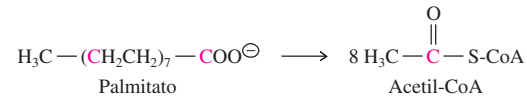
b)



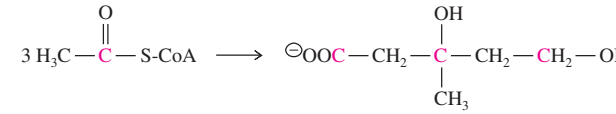
c)



16. El palmitato se convierte en ocho moléculas de acetil-CoA marcadas en el C-1. Se usan tres moléculas de acetil-CoA para sintetizar una molécula de mevalonato (figura 16.15).



Palmitato — Acetil-CoA



Acetil-CoA — Mevalonato

Capítulo 17
Metabolismo de aminoácidos

1. El PSII contiene el complejo productor de oxígeno que se produce durante la fotosíntesis. Como el oxígeno inhibe a la nitrogenasa, se debe evitar la síntesis de O_2 en los heterocistos. Debe conservarse el PSI, porque todavía puede generar un gradiente de protones inducido por la luz, por el transporte cíclico de electrones, y no interviene en la producción de O_2.

2. a) Glutamato deshidrogenasa + glutamina sintetasa

$$NH_4^{\oplus} + \alpha\text{-Cetoglutarato} + NAD(P)H + H^{\oplus} \longrightarrow \text{Glutamato} + NAD(P)^{\oplus} + H_2O$$
$$NH_3 + \text{Glutamato} + ATP \longrightarrow \text{Glutamina} + ADP + P_i$$
$$2\,NH_4^{\oplus} + \alpha\text{-Cetoglutarato} + NAD(P)H + ATP \longrightarrow \text{Glutamina} + NAD(P)^{\oplus} + ADP + P_i + H_2O$$

b) Glutamina sintetasa + glutamato sintasa

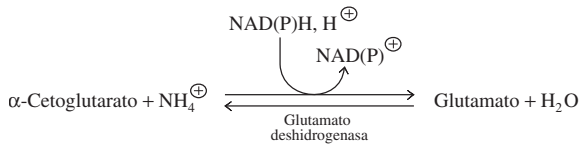
$$2\,NH_3 + 2\,\text{Glutamato} + 2\,ATP \longrightarrow 2\,\text{Glutamina} + 2\,ADP + 2\,P_i$$
$$\text{Glutamina} + \alpha\text{-Cetoglutarate} + NAD(P)H + H^{\oplus} \longrightarrow 2\,\text{Glutamato} + NAD(P)^{\oplus}$$
$$2\,NH_3 + \alpha\text{-Cetoglutarato} + NAD(P)H + 2\,ATP + H^{\oplus} \longrightarrow \text{Glutamina} + NAP(P)^{\oplus} + 2\,ADP + 2\,P_i$$

Las reacciones acopladas en el punto b) consumen más moléculas de ATP que las del punto a). Como la K_m de la glutamina sintetasa para el NH_3 es mucho menor que la K_m de la glutamato deshidrogenasa para el $NH_4^{\oplus}$, predominan las reacciones acopladas en b) cuando las concentraciones de $NH_4^{\oplus}$ son bajas. Así, se gasta más energía para asimilar amoniaco cuando su concentración es baja.

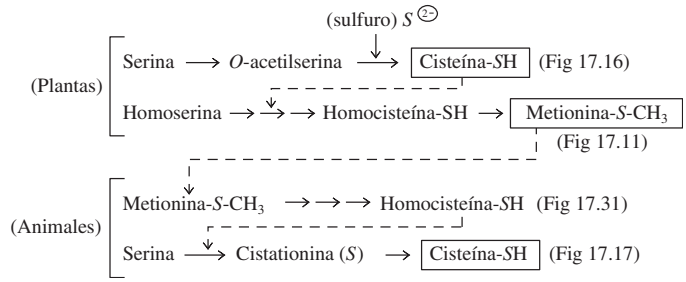
3. El grupo amino marcado con ^{15}N-labeled se transfiere de aspartato a α-cetoglutarato, produciendo glutamato en una reacción catalizada por la aspartato transaminasa (figura 17.10). Como las transaminasas catalizan reacciones cercanas al equilibrio y muchas transaminasas usan glutamato como donador de grupo α-amino, el nitrógeno marcado se distribuye con rapidez entre los demás aminoácidos que sean sustratos para las transaminasas dependientes de glutamato.

4. a) α-Cetoglutarato + Aminoácido $\rightleftharpoons$ Glutamato + α-Cetoácido
Oxaloacetato + Aminoácido $\rightleftharpoons$ Aspartato + α-Cetoácido
Piruvato + Aminoácido $\rightleftharpoons$ Alanina + α-Cetoácido

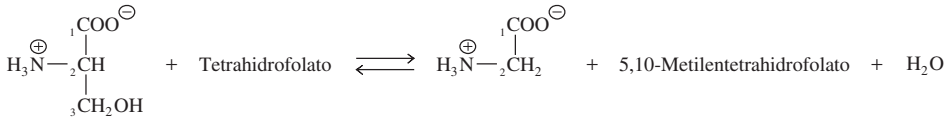
b)



5.

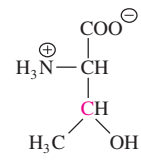


6. a) El C-3 de la serina se transfiere al tetrahidrofolato durante la síntesis de la glicina, y el C-2 se transfiere al tetrahidrofolato cuando la glicina se escinde para producir amoniaco y bicarbonato.

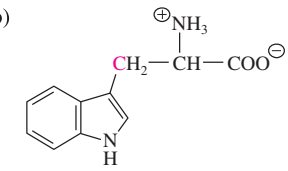


b) La serina se sintetiza a partir del 3-fosfoglicerato (figura 17.14), compuesto intermedio de la glicólisis. El C-3, tanto del 3-fosfoglicerato como de la serina se deriva ya sea del C-1 o del C-6 de la glucosa, y el C-2, tanto del 3-fosfoglicerato como de la serina se deriva del C-2 o del C-5 de la glucosa.

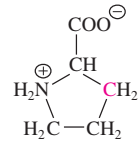
7. a)



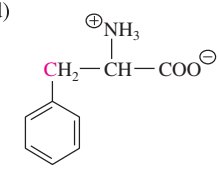
b)



c)



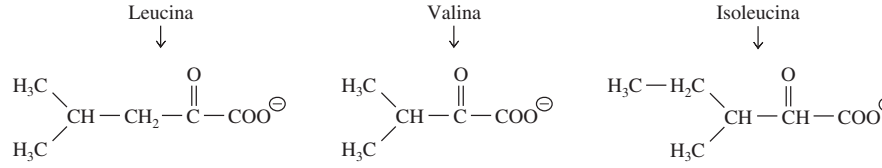
d)



8. a) Ácido glutámico. El PPT inhibe a la glutamina sintetasa.
b) Ruta de la biosíntesis de la histidina (figura 17.22).

9. El aspartame es un dipéptido formado por un residuo de aspartato y uno de fenilalanina unidos por un enlace peptídico. Este enlace al final se hidroliza dentro de la célula produciendo aspartato y fenilalanina. Los pacientes con fenilcetonuria deben evitar todo exceso de fenilalanina.

10. a)



b) Ruta de degradación de la lisina. La α-amionoadipato δ-semialdehído sintasa es deficiente (figura 17.35).
c) Ciclo de la urea. La argininosuccinato sintetasa es deficiente (figura 17.39).

11. a) Alanina
b) Aspartato
c) Glicina
d) Cisteína

12. El ciclo de la urea no trabaja en los músculos, por lo que no puede convertirse el amoniaco de la desaminación de los aminoácidos a urea. Ya que las altas concentraciones de amoniaco son tóxicas, el amoniaco se convierte en otros productos de desecho. En la primera ruta, el amoniaco se incorpora a la glutamina por acción de la glutamina sintetasa (figura 17.4). La glutamina puede transportarse entonces al hígado o a los riñones. La segunda ruta es el ciclo glucosa-alanina (figura 17.41). El piruvato acepta el grupo amino de los aminoácidos por transaminación, y la alanina producida es transportada al

hígado, donde puede desaminarse y regresar a piruvato. El grupo amino se usa en la síntesis de la urea, y el piruvato se puede convertir en glucosa.

13. La inhibición de la óxido nítrico sintasa (NOS) puede evitar la producción de cantidades excesivas de óxido nítrico en las células que cubren a los vasos sanguíneos. El óxido nítrico causa relajación de los vasos, y en cantidades excesivas puede reducir la presión sanguínea causando choque. La tiocitrulina y la *S*-metiltiocitrulina inhiben a la NOS, porque son análogos inertes de la citrulina, producto de la reacción de NOS (figura 17.24).

14. El Premio Nobel 2004 fue para Aaron Ciechanover, Avram Hershko e Irwin Rose "por descubrir la degradación de proteínas mediada por ubiquitina". En la sección 17.5 se describe la ubiquinación. Causa degradación de proteínas, y la degradación de proteínas es una fuente de aminoácidos que se pueden descomponer para producir energía.

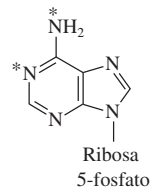
15. Hay dos razones. La primera es que muchas de las rutas de la biosíntesis de los aminoácidos no se encuentran en los humanos, por lo que no habría enfermedades metabólicas de rutas de aminoácidos no esenciales que no existen. En segundo lugar, es probable que las rutas restantes sean importantísimas durante el desarrollo, por lo que es probable que cualquier defecto en esas rutas sea letal. Es el mismo razonamiento que se usó para explicar la carencia de enfermedades metabólicas en las rutas de la biosíntesis de los esfingolípidos (recuadro 16.2).

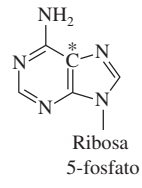
16. Los aminoácidos 21 y 22 son selenocisteína y pirrolisina. La selenocisteína se sintetiza durante la traducción de ARNt aminoacilado, y no por las rutas metabólicas normales descritas en este capítulo. También la pirrolisina se puede sintetizar en ARNt aminoacilado. Los precursores son serina y lisina.

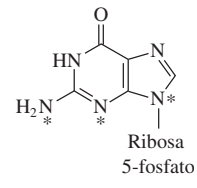
17. El precursor en la ruta de la biosíntesis de la serina es 3-fosfoglicerato. Este precursor se puede derivar del gliceraldehído-3-fosfato (G3P) en la ruta glicolítica, cuando la conversión se asocia a la *ganancia* de 1 ATP + 1 NADH. Esta ganancia debe restarse del costo total de la síntesis del G3P. Por consiguiente, el costo de obtener 3-fosfoglicerato es 24 − 3.5 = 20.5 equivalentes de ATP, suponiendo que cada NADH equivale a 2.5 ATP. (El mismo costo se puede calcular de la ruta del ciclo de Calvin en la figura 15.19). La ruta de biosíntesis de la serina produce un NADH cuando se oxida el 3-fosfoglicerato a 3-fosfohidroxipiruvato, por lo que el siguiente costo de obtener serina es de 0.5 − 2.5 = 18 equivalentes de ATP. Este valor es idéntico al que aparece en el recuadro 17.3. (Nótese que la reacción de la transaminación en la ruta de biosíntesis de la serina es sin costo).

La alanina se forma a partir del piruvato en una reacción de transaminación simple y sin costo. El costo de obtener piruvato se puede estimar de la conversión del 3-fosfoglicerato a piruvato, en la ruta glicolítica. Esta conversión está asociada a una ganancia de 1 ATP, por lo que el costo de piruvato es de 20.5 − 1 = 19.5 equivalentes de ATP. Así, el costo de sintetizar alanina es de 19.5 equivalentes de ATP, o 20 equivalentes de ATP cuando se redondea a dos cifras significativas. Este valor es igual al del recuadro 17.3.

Capítulo 18
Metabolismo de nucleótidos

1. a) 

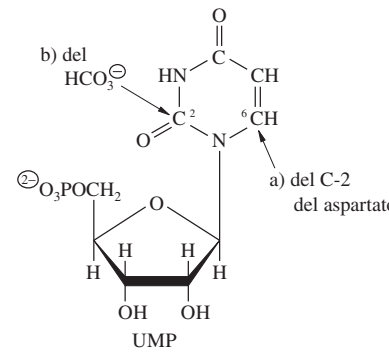
b) 

c) 

Véanse las reacciones de la ruta de síntesis del UMP en la figura 18.10.

d) El C-2 marcado del aspartato, que se incorpora al aspartato de carbamoílo, aparece en el C-6 del uracilo de UMP.

e) El carbono marcado del $HCO_3^{\ominus}$, que se incorpora al fosfato de carbamoílo, aparece en el C-2 del anillo de pirimidina en el monofosfato de uridina (UMP).



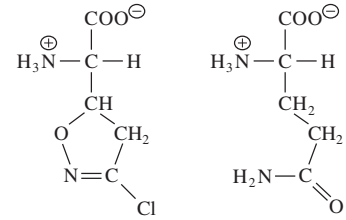
2. Se requieren siete equivalentes de ATP. Un ATP se escinde y forma AMP cuando se sintetiza el PRPP (figura 18.3). El grupo pirofosforilo del PRPP se libera en el paso 1 de la ruta de la biosíntesis del IMP y después se hidroliza a 2 P_i (figura 18.5), y es el segundo equivalente de ATP. Se consumen cinco moléculas de ATP en los pasos 2, 4, 5, 6 y 7.

3. Purinas: Reacción 3: GAR transformilasa 10-formil-THF, posición C-8.

Reacción 9: AICAR transformilasa, 10-formil-THF, posición C-2.

Pirimidinas: Timidilato sintasa, 5,10-metilen-THF, el CH_3 5 del timidilato.

4. a)

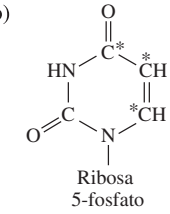


b) La acivicina inhibe la glutamina-PRPP amidotransferasa, la primera enzima en la ruta de la biosíntesis de purinas, por lo que se acumula el PRPP.

c) La acivicina inhibe la actividad de la carbamoíl fosfato sintetasa II de la dihidroorotato sintasa, que cataliza el primer paso en la ruta de la biosíntesis de pirimidinas.

5. a) Cuando se usa la β-alanina en vez de aspartato, no se necesitaría la reacción de descarboxilación (paso 6 de la ruta de *E. coli*).

b)



6. a) dUMP + $NH_4^{\oplus}$

b) La síntesis de ADN requiere ciertas relaciones de A, T, G y C. Si las concentraciones de dTTP son mayores que lo necesario, la dTTP actuará disminuyendo su propia ruta de síntesis por inhibición de la conversión de dCMP a dUMP por la dCMP desaminasa. El dUMP es precursor de dTMP (timidilato sintasa, figura 18.15), y la conversión siguiente a dTDP y dTTP (necesaria para la síntesis de ADN). Por otra parte, si son altas las concentraciones de dCTP, la activación de la dCMP desaminasa causará mayor conversión de dCMP en dUMP y eso desvía a todo dCMP que se pudiera haber convertido a más dCTP por fosforilación (figura 18.19).

7. Se requieren cuatro equivalentes de ATP. Uno para la síntesis de PRPP a partir de la ribosa 5-fosfato (figura 18.3). La síntesis de fosfato de carbamoílo requiere 2 ATP (figura 18.10, paso 1). Se consume un equivalente de ATP en el paso 5, cuando el PP_i se hidroliza a 2 P_i.

8. En ausencia de la adenosina desaminasa, la adenosina y la desoxiadenosina no se degradan pasando por inosina e hipoxantina a ácido úrico (figuras 18.18 y 18.20). Eso causa aumento en la concentración de desoxiadenosina, que se puede convertir en dATP. Las altas concentraciones de dATP inhiben a la ribonucleótido reductasa (tabla 18.1). La inhibición de la ribonucleótido reductasa causa menor producción de todos los desoxinucleótidos, y en consecuencia inhibe la síntesis de ADN.

9. El ciclo de las purinas nucleótido en los músculos (figura 18.22) aporta algo de las necesidades de energía en los músculos que se ejercitan. Una deficiencia de mioadenilato desaminasa limita la cantidad del fumarato proporcionado al ciclo del ácido cítrico, y en consecuencia disminuye las cantidades de ATP disponibles para la contracción muscular.

10. La glutamina-PRPP aminotransferasa es la primera enzima y el sitio principal de regulación de la ruta *de novo* a la IMP (figura 18.5). En los humanos, el PRPP es a la vez un sustrato y un efector positivo de esta enzima. Un aumento en las concentraciones celulares de PRPP debido a la alta actividad de la PRPP sintetasa elevará en consecuencia la actividad de la amidotransferasa. Eso dará como resultado más síntesis de IMP y otros nucleótidos de purina. La sobreproducción de nucleótidos de purina y su degradación siguiente pueden causar las concentraciones elevadas de ácido úrico características de la gota.

11. a) ATP b) ATP c) ATP d) GTP e) UTP f) GTP g) CTP h) UTP i) ATP j) IMP k) IMP

12. Las purinas y las pirimidinas no son fuentes apreciables de energía. Los átomos de carbono de los ácidos grasos y los carbohidratos se pueden oxidar para formar ATP, pero no hay rutas comparables productoras de energía para las purinas y pirimidinas, que contienen nitrógeno. Sin embargo, el NADH producido cuando se convierte hipoxantina en ácido úrico puede generar ATP indirectamente por fosforilación oxidativa. La degradación de uracilo y timina produce acetil-CoA y succinil-CoA, respectivamente, que se pueden metabolizar por la vía del ciclo del ácido cítrico, para generar ATP.

13. El azúcar D-ribosa existe como mezcla en equilibrio de la α-D-ribopiranosa, la α-D-ribofuranosa, la β-D-ribopiranosa y la β-D-ribofuranosa. Estas formas se interconvierten libremente y cada una pasa por la forma de cadena abierta (sección 8.2).

14. La xantina es 2,6-dioxopurina; la hipoxantina es 6-oxopurina, el orotato es 2,4-dioxo-6-carboxil-pirimidina.

15. SAICAR sintetasa + adenilosuccinato liasa en la ruta de la biosíntesis del IMP (figura 8.5) y argininosuccinato sintetasa + argininosuccinato liasa en la ruta de la biosíntesis de la arginina (ciclo de la urea, figura 17.39).

Capítulo 19
Ácidos nucleicos

1. En la α hélice, los puentes de hidrógeno se forman entre el oxígeno carbonílico de un residuo y el hidrógeno de amina a cuatro residuos, o una vuelta, de distancia. Esos puentes de hidrógeno entre átomos del esqueleto son aproximadamente paralelos al eje de la hélice. Las cadenas laterales de aminoácidos, que apuntan alejándose del esqueleto, no participan en los puentes de hidrógeno intrahélice. En el ADN de doble hebra, el esqueleto de azúcar-fosfato no interviene en los puentes de hidrógeno. En su lugar, se forman dos o tres puentes de hidrógeno, aproximadamente perpendiculares al eje de la hélice, entre las bases complementarias de las hebras opuestas.

En la α hélice, los puentes de hidrógeno individuales son débiles, pero las fuerzas acumulativas de ellos estabilizan a la estructura helicoidal, en especial en el interior hidrofóbico de una proteína, donde no compite el agua para formar puentes de hidrógeno. En el ADN, el papel principal de los puentes de hidrógeno es permitir que cada hebra actúe como plantilla para la otra. Aunque los puentes de hidrógeno entre bases complementarias ayudan a estabilizar la hélice, las interacciones de apilamiento entre los pares de bases en el interior hidrofóbico contribuyen más a la estabilidad de la hélice.

2. Si el 58% de los residuos son (G + C), el 42% de los residuos deben ser (A + T). Ya que cada A se aparea con una T de la hebra opuesta, la cantidad de residuos de adenina es igual a la cantidad de residuos de timina. Entonces, el 21%, o 420, de los residuos son timina ($2\,000 \times 0.21 = 420$).

3. a) Las composiciones de las hebras complementarias del ADN, en bases, suelen ser bastante diferentes. Por ejemplo, si una hebra es poli dA (100% de A) la otra debe ser poli dT (100% de T). Sin embargo, como las dos hebras son complementarias, la cantidad de (A + T) debe ser igual para cada hebra y la cantidad de (G + C) debe ser igual para cada hebra.

b) (A + G) = (T + C). La complementariedad establece que por cada purina (A o G) en una hebra, debe haber una pirimidina (T o C) en la hebra complementaria.

4. Como las hebras de ADN son antiparalelas, la hebra complementaria corre en dirección contraria. La secuencia del ADN de doble hebra es

ATCGCGTAACATGGATTCGG

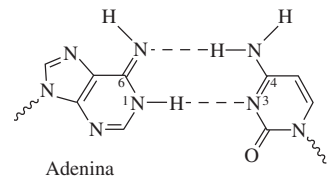
TAGCGCATTGTACCTAAGCC

Por convención, las secuencias del ADN se escriben en la dirección de $5' \rightarrow 3'$. Por consiguiente, la secuencia de la hebra complementaria es

CCGAATCCATGTTACGCGAT

5. La estabilidad de la hélice de una hebra se debe en gran parte a las interacciones de apilamiento entre purinas adyacentes. También contribuyen los efectos hidrofóbicos, porque las bases apiladas forman un ambiente que está parcialmente blindado contra moléculas de agua.

6.



Adenina (forma imino) Citosina

7. Habrá dos puntos discretos de fusión separados por una meseta. Cuando la hebra adicional de poli dT se suelta, la absorbancia de la solución a 260 nm aumentará a medida que las bases apiladas dejen el interior principalmente hidrofóbico de la triple hélice. Un segundo incremento de absorbancia sucede cuando se desnaturalizan las dos hebras restantes de ADN.

8. La secuencia es

5′ ACGCACGUAUAUGUACUUAUACGUGGCU 3′

Las secuencias subrayadas son palindrómicas.

9. Los productos principales serán una mezcla de mononucleótidos *y* de trozos de ADN de una hebra, con una longitud aproximada de 500 pb. Un trozo de ADN con la molécula de enzima unida a cada extremo se degradará hasta que las dos hebras ya no puedan aparear sus bases; en ese punto, las hebras sencillas cesan de ser un sustrato para la enzima.

10. En la fibra de 30 nm, el ADN está empacado en nucleosomas, cada uno con aproximadamente 200 pb de ADN; por consiguiente, el ADN en un nucleosoma tiene un peso molecular de 130 000 (200 × 650 = 130 000). Suponiendo que hay una molécula de histona H1 por nucleosoma, el peso molecular del componente de proteína en el nucleosoma sería de 129 800.

Histona H1	21000
Histona H2A (×2)	28000
Histona H2 B (×2)	27600
Histona H3 (×2)	30600
Histona H4 (×2)	22600
Total	129800

Así, la relación de proteína a ADN, en peso, es de 129 800:130 000, aproximadamente 1:1.

11. Los nucleosomas están formados por histonas más 200 pares de bases de ADN. Como el lector heredó la mitad de los cromosomas de su madre, el oocito contenía

$$(3.2 \times 10^9 \text{ bp}) \times \frac{1 \text{ nucleosoma}}{200 \text{ bp}} = 8 \times 10^6 \text{ nucleosomas}$$

(Usted no heredó nucleosomas de su padre, porque los nucleosomas son sustituidos por polipéptidos pequeños con carga positiva durante la espematogénesis).

12. a) pdApdGpdT + pdC

b) pdAp + dGpdTpdC

c) pdA + pdGpdTpdC

13. Como el ADN superenrollado del plásmido está en equilibrio con ADN relajado que contiene cortas regiones no torcidas, la enzima de *Aspegillus* convertirá lentamente el ADN en círculos con muescas. Al final la enzima convertirá los círculos liberados en fragmentos lineales de longitud unitaria, de ADN de doble hebra.

14. Sí. El esqueleto de azúcar-fosfato, tanto en el ARN como en el ADN, contiene enlaces de fosfodiéster, que unen a residuos de azúcar.

15. pppApCpUpCpApUpApGp + CpUpApUpGp + ApGp + U

16. En los bacteriófagos han evolucionado varios mecanismos que protegen su ADN contra las endonucleasas de restricción. En general, el ADN de bacteriófago contiene pocos sitios de restricción. Los sitios de reconocimiento de la endonucleasa de restricción se seleccionan mucho para omitirlo, y toda mutación que altera esos sitios será favorecida. Además, los sitios de restricción están metilados con frecuencia, como en el cromosoma bacteriano. Tal vez eso se deba a un evento fortuito en el pasado lejano, cuando el ADN fago se metiló antes de poderse escindir.

Algunos bacteriófagos incorporan nucleótidos modificados en su ADN. Los nucleótidos modificados (como la 5-hidroximetilcitosina en el bacteriófago T4) no son reconocidos por las endonucleasas de restricción.

Los genomas de fago también pueden codificar una enzima que inactive las endonucleasas de restricción, o pueden codificar proteínas que se unan a sitios de restricción para evitar la ruptura.

17. a) Se puede calcular la probabilidad a partir de la probabilidad de cada nucleótido en el sitio de restricción *Hind* III (G = C = 0.18 y A = T = 0.32)

Para la secuencia AAGCTT habrá, en promedio, un sitio *Hind*III cada

$1/(0.32)(0.32)(0.18)(0.18)(0.32)(0.32) = 2943$ bp

Thus, in a 100 Mb genome there will be, on average,

100 000/2 943 = 33 070 sitios

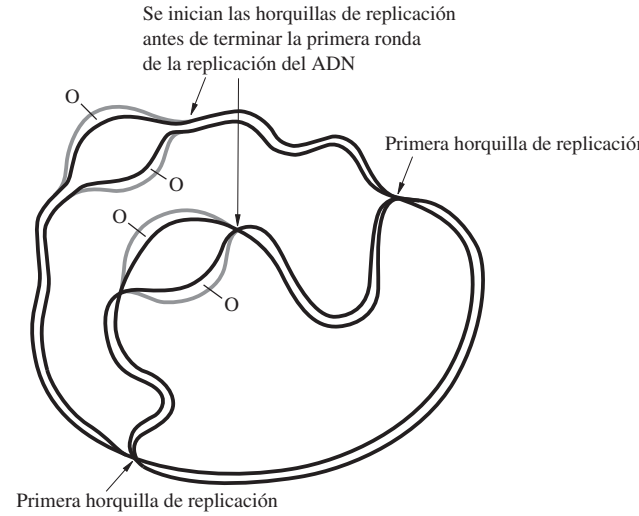
b) 24 414

Capítulo 20
Replicación, reparación y recombinación del ADN

1. a) Se forman dos horquillas de replicación en el origen de replicación, y se mueven en direcciones contrarias hasta encontrarse en un punto opuesto al origen. Por consiguiente, cada replisoma replica a la mitad del genoma (2.6×10^6 pares de bases). El tiempo necesario para replicar todo el cromosoma es

$$\frac{2.6 \times 10^6 \text{ pares de bases}}{1\,000 \text{ pares de bases s}^{-1}} = 2600 \text{ s} = 43 \text{ min días } 20 \text{ s}$$

b) Aunque sólo hay un origen (O), la replicación puede volver a iniciarse antes que las horquillas de replicación anteriores hayan alcanzado el sitio de terminación. Así, el cromosoma puede contener más de dos horquillas de replicación. La replicación de un solo cromosoma sigue requiriendo unos 43 minutos, pero las copias terminadas de cada cromosoma pueden aparecer a intervalos menores, dependiendo de la velocidad de inicio.



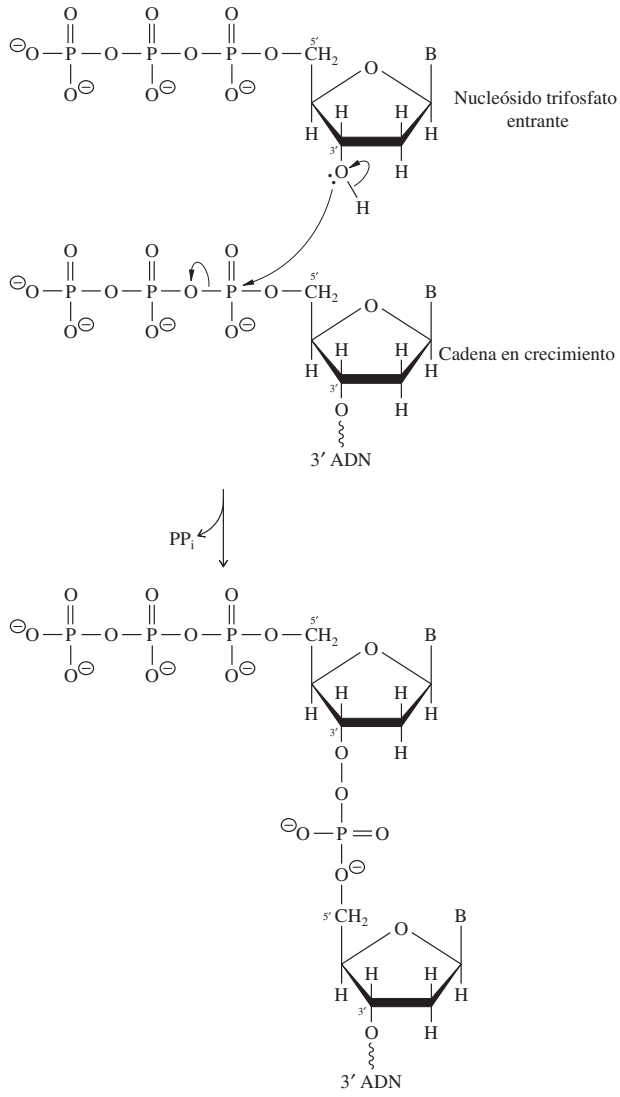
2. La T4 ADN polimerasa debería ser un producto genético temprano, porque se requiere para la replicación del genoma viral.

3. a) La plantilla de ADN de una hebra que se usa en la síntesis *in vitro* de ADN puede formar estructuras secundarias como horquillas. La SSB evita la formación de la estructura de doble hebra uniéndose a la plantilla de una hebra. De ese modo la SSB hace que el ADN sea mejor sustrato para la ADN polimerasa.

b) El rendimiento de ADN *in vitro* se mejora a mayores temperaturas, porque es menos probable la formación de la estructura secundaria en la plantilla. Una temperatura de 65 °C es suficientemente alta para evitar la formación de estructura secundaria, pero no lo bastante alta como para desnaturalizar el ADN recién sintetizado. Se usan ADN polimerasas de bacterias que crecen a altas temperaturas, porque son activas a 65 °C, temperatura a la cual las ADN polimerasas de otras bacterias serían inactivas.

4. Una replicación extremadamente exacta del ADN requiere un mecanismo de comprobación para eliminar errores introducidos durante la reacción de polimerización. La síntesis de un ARN cebador por una primasa, que no tiene actividad de corrección, es más susceptible a errores que la síntesis de ADN. Sin embargo, como el cebador es ARN, se puede eliminar por la actividad de la exonucleasa $5' \rightarrow 3'$ de la ADN polimerasa I, y sustituir con ADN sintetizado con exactitud, cuando se unen fragmentos de Okazaki. Si el cebador fuera de ADN hecho por una primasa sin actividad correctora, no se eliminaría por la ADN polimerasa I, y la tasa de errores en la replicación de ADN sería mayor en los sitios de síntesis de cebador.

5. a) En la reacción hipotética de transferencia del grupo nubleotidilo, el grupo 3′-hidroxilo del nucleótido *entrante* atacaría al grupo trifosfato de la cadena en crecimiento. Se liberaría pirofosfato cuando se formara un nuevo enlace de fosfodiéster.



b) Si la enzima hipotética tuviera actividad de corrección $5' \rightarrow 3'$, la eliminación de un nucleótido mal ubicado dejaría un grupo 5′-monofosfato en el extremo de la cadena en crecimiento. No podría haber más síntesis de ADN, porque necesitaría un grupo trifosfato terminal.

6. La topoisomerasa II o la girasa impide el superenrollamiento adelante y atrás de la horquilla de replicación. Si se inhibe esta enzima, el desenrollamiento del ADN parental no podría efectuarse. Por consiguiente, el ADN de *E. coli* no podría replicarse.

7. a) Suponga que el genoma es una molécula de ADN lineal y grande, y que el origen de la replicación está a la mitad de este cromosoma. Como las horquillas de replicación se mueven en direcciones opuestas, se pueden replicar 60 pares de bases por segundo. El tiempo necesario para replicar todo el genoma sería

$$\frac{1.65 \times 10^8 \text{ pares de bases}}{60 \text{ pares de bases s}^{-1}} = 2.75 \times 10^6 \text{ s} = 764 \text{ h} = 32 \text{ días}$$

b) Suponiendo que los 2 000 orígenes bidireccionales están igualmente distribuidos a lo largo de la molécula de ADN y que la iniciación sucede en forma simultánea en todos los orígenes, la velocidad sería de $2\,000 \times 2 \times 30$ pares de bases por segundo, o 1.2×10^5 pares de bases por segundo. El tiempo necesario para replicar todo el genoma sería

$$\frac{1.65 \times 10^8 \text{ pares de bases}}{1.2 \times 10^5 \text{ pares de bases s}^{-1}} = 1375 \text{ s} = 23 \text{ min}$$

c) Suponiendo que todos los orígenes estén igualmente distribuidos, y que el inicio es simultáneo en todos los orígenes, la velocidad de replicación requerida es

$$\frac{1.65 \times 10^8 \text{ pares de bases}}{300 \text{ s}} = 5.5 \times 10^5 \text{ pares de bases s}^{-1}$$

La replicación bidireccional de cada horquilla se efectúa a una velocidad general de 60 pares de bases por segundo. La cantidad mínima de orígenes sería

$$\frac{5.5 \times 10^5 \text{ pares de bases s}^{-1}}{60 \text{ pares de bases s}^{-1} \text{ orígenes}^{-1}} = 9170 \text{ orígenes}$$

8. La G modificada no puede ya formar un par de bases productivas de Watson-Crick con C, pero ahora puede formar par de bases con T. Por consiguiente, una de las hebras hijas de ADN contendrá una T opuesta a la base modificada. Después de más rondas de replicación, la T se aparearía con base con A, y lo que era originalmente un par de bases G/C habrá mutado a un par de bases A/T.

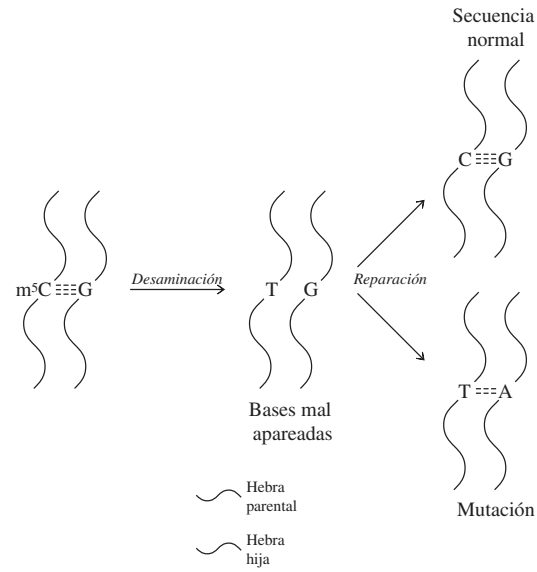
9. La luz ultravioleta puede dañar al ADN porque causa dimerización de residuos de timidilato. Un mecanismo para reparar dímeros de timina es la fotorreactivación enzimática, catalizada por la ADN fotoliasa. Esta enzima usa energía de la luz visible para romper el dímero y reparar el ADN. Así, las células que se exponen a la luz visible después de la irradiación ultravioleta pueden reparar mejor el ADN que las células que se mantienen en la oscuridad.

10. a) El ADN de una cepa *dut*$^-$ parecerá normal, porque la enzima Ung eliminará todo uracilo que se haya incorporado.

b) El ADN de una cepa *dut*$^-$, *ung*$^-$ contendrá residuos de dU en lugar de algunos residuos de dT.

11. La enzima reparadora de ADN, la uracil-*N*-glicosilasa elimina al uracilo formado por desaminación hidrolítica de la citosina. Como la enzima no reconoce a la timina ni a las otras tres bases que se encuentran normalmente en el ADN, no puede reparar el daño cuando la 5-metilcitosina se desamina a timina.

12. Hay altas tasas de mutación en regiones que contienen metilcitosina, porque el producto de desaminación de la 5-metilcitosina es timina, que no se puede reconocer como anormal. Cuando se repara el par de bases T/G que resulta de la desaminación de metilcitosina, las enzimas de reparación pueden eliminar ya sea la timina incorrecta o la guanina correcta. Cuando la guanina se reemplaza por adenina, el par de bases A/T que resulta es una mutación.



13. La corrección durante la replicación causa la escisión del 99% de los nucleótidos mal incorporados, reduciendo así la tasa general de errores a 10^{-7}. De los errores que escapan al paso de corrección, las enzimas de reparación corrigen otro 99%. Por consiguiente, la tasa total de mutación es del 10^{-9}.

14. Sí. La enzima ADN ligasa de *E. coli* se requiere para sellar las muescas que quedan en las hebras de ADN después de la reparación del ADN. Esta enzima tiene una necesidad estricta de $NAD^{\oplus}$.

15. Los dímeros se pueden eliminar con reparación por escisión. La UvrABC endonucleasa elimina un segmento de 12-13 residuos que contiene al dímero de pirimidina. El oligonucleótido de ADN se elimina con ayuda de una helicasa. El hueco se llena por acción de la ADN polimerasa I, y la muesca se sella por acción de la ADN ligasa. También, los dímeros se pueden reparar en forma directa. La ADN fotoliasa se une a la doble hélice distorsionada en el sitio del dímero. Cuando el complejo de ADN-enzima absorbe luz, se invierte la reacción de dimerización.

16. Las enzimas de reparación necesitan una plantilla no dañada para reparar mutaciones en el ADN. Si se han dañado las dos hebras de la molécula de ADN, no hay plantilla que se pueda usar en la reparación.

17. Las proteínas que catalizan el intercambio de hebras reconocen regiones de mayor similitud de secuencia y promueven la formación de un intermedio de triple hebra, en donde la hebra invasora aparea sus bases con una hebra complementaria. Este apareamiento no sería posible si las secuencias de las dos moléculas de ADN fueran diferentes.

18. La ADN polimerasa III es un componente del replisoma que sintetiza la hebra adelantada y la hebra retrasada durante la replicación del cromosoma de *E. coli*. La ADN polimerasa I se requiere para eliminar los cortos cebadores de ARN en la hebra retrasada.

Capítulo 21
Transcripción y procesamiento de ARN

1. a) Como la velocidad de transcripción es de 70 nucleótidos por segundo, y cada complejo de transcripción cubre 70 pares de bases de ADN, una ARN polimerasa completa un transcrito y deja la plantilla de ADN cada segundo (suponiendo que los complejos tengan empacamiento denso). Por consiguiente, cuando el gen se carga con complejos de transcripción, se producen 60 moléculas de ARN por minuto.

b) Como cada complejo de transcripción cubre 70 pares de bases, la cantidad máxima de complejos es

$$\frac{\text{6000 pares de bases}}{\text{70 pares de bases/complejo de transcripción}} = \text{86 complejos de transcripción}$$

2. a) Como el gen promedio de *E. coli* tiene 1 kb (1 000 pb) de longitud, 4 000 genes tienen 4 000 kb de ADN. El porcentaje de ADN que no se transcribe es

$$\frac{\text{500 kb}}{\text{4600 kb}} \times 100\% = 10.9\%$$

La mayor parte del ADN no transcrito consiste en promotores y regiones que regulan el inicio de la transcripción.

b) Como los productos genéticos en mamíferos y en bacterias tienen tamaños similares, la cantidad de ADN en los exones de un gen típico de mamífero también debe tener 1 000 pb. La cantidad total de ADN en los exones es

$$5 \times 10^4 \text{ genes} \times 1.0 \text{ kb gen}^{-1} = 5 \times 10^4 \text{ kb}$$

Este ADN representa aproximadamente 1.7% del genoma del mamífero.

$$\frac{5 \times 10^4 \text{ kb}}{3 \times 10^6 \text{ kb}} \times 100\% = 1.7\%$$

El 97.5% restante del ADN consiste en intrones y otras secuencias.

3. No. Es extremadamente improbable que el promotor de gen eucariótico contenga las secuencias correctas en el lugar correcto para permitir un inicio exacto por parte de las

ARN polimerasas procarióticas. De igual manera, es extremadamente improbable que el promotor de gen procariótico contenga la correcta secuencia en el lugar correcto para permitir un inicio exacto por la ARN polimerasa II.

4. No. Una triosa fosfato isomerasa eucariótica típica contiene intrones. La célula procariótica no contiene espliceosomas, y en consecuencia no podrá procesar en forma correcta el transcrito primario. Así, la traducción del ARN formará un fragmento de proteína aberrante.

5. a) En presencia de lactosa y glucosa, el operón *lac* se transcribe a bajo nivel, porque el represor *lac* contiene un complejo con alolactosa (un isómero de lactosa). Como el complejo alolactosa-represor no puede unirse a la región promotora del operón *lac*, el represor no evita el inicio de la transcripción.

b) En ausencia de lactosa, no se forma alolactosa. Así, el represor *lac* se une cerca del promotor del operón *lac* y evita la transcripción.

c) Cuando la lactosa es la única fuente de carbono, el operón *lac* se transcribe a la velocidad máxima. En presencia de alolactosa, se permite la transcripción, porque el represor *lac* no se une a la región promotora del operón *lac*. También, en ausencia de glucosa, la velocidad de transcripción aumenta, porque se eleva la producción de cAMP y hay más CRP-cAMP disponible para unirse a la región promotora del operón *lac*. La ausencia del represor y la promoción de inicio de la transcripción por el CRP-cAMP permiten a la célula sintetizar las cantidades necesarias de enzimas para sostener el crecimiento cuando la única fuente de carbono es la lactosa.

6. Como el promotor *lac* de tipo silvestre es relativamente débil, una transcripción máxima requiere del activador CRP. Las mutaciones UV5 alteran la región -10, de tal modo que ahora se parece a la secuencia de consenso -10, haciéndola un promotor mucho más fuerte. En ausencia del represor *lac*, el promotor es independiente de la CRP.

7. El ^{32}P sólo aparece en el extremo 5′ de las moléculas de ARNm que tienen ATP como primer residuo. No aparece en ningún otro residuo, porque el pirofosfato, que incluye al grupo β-fosforilo, se libera cuando se agregan nucleósido trifosfatos al extremo 3′ de una cadena de ARN en crecimiento (figura 21.3).

Cuando el extremo 5′ de ARNm es cubierto por el casquete, sólo se elimina el residuo inicial del grupo γ-fosforilo cuando se forma el casquete. El grupo β-fosforilo, que contiene la marca, se conserva y recibe al grupo GMP de la GTP (figura 21.26).

8. La carencia de actividad correctora en la ARN polimerasa hace que la frecuencia de errores de transcripción sea mayor que la tasa de errores de replicación de ADN. Sin embargo, no es probable que las moléculas defectuosas de ARN producidas afecten la viabilidad de la célula, porque la mayor parte de las copias de ARN sintetizadas de determinado gen son normales. En el caso de ARNm defectuoso, la cantidad de proteínas defectuosas sólo es un pequeño porcentaje de la cantidad total de proteínas sintetizadas. También, los errores cometidos durante la transcripción se eliminan con rapidez, porque la mayor parte de las moléculas de ARNm tienen una vida media corta.

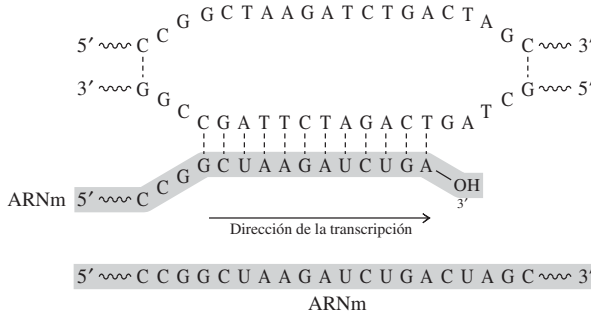
9. Durante la mutación, se modifican los ARNm precursores en sus extremos 3′ por la adición de una cola de poli A. Cuando se pasa una mezcla de componentes de un extracto celular por la columna, la cola de poli A se hibridará con oligo dT en la columna. Los demás componentes del extracto celular pasarán por la columna. El ARNm maduro ligado a la cola de poli A se saca de la columna cambiando el pH o la fuerza iónica del regulador. Con eso se rompen los puentes de hidrógeno entre los nucleótidos A y T.

10. a) Una concentración mucho menor (<5 μg/mL) de rifampicina detuvo el crecimiento de *E. coli*, en comparación con la concentración de rifampicina que detuvo el crecimiento del mutante (>50 μg/mL).

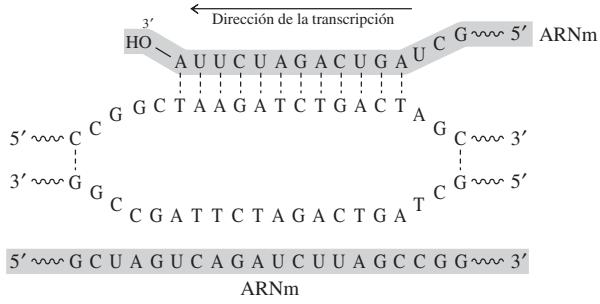
b) La ARN polimerasa está formada por una enzima central con la estequiometría $\alpha_2\beta\beta'\omega$ que participa en muchas de las reacciones de transcripción. Las subunidades grandes, β y β' forman el sitio activo de la enzima.

c) Las bacterias resistentes a la rifampicina podrían proceder de mutaciones que suceden en el gen para la subunidad β de la ARN polimerasa.

11. Ya que cada hebra puede servir como plantilla, se pueden transcribir dos moléculas de ARNm a partir de este segmento de ADN. Cuando la hebra inferior es la plantilla, la secuencia de ARNm es complementaria a esta hebra.



Cuando la hebra superior es la plantilla, la secuencia del ARNm es complementaria a esta hebra.



12. Se definió el gen como una secuencia de ADN que se transcribe. Según esa definición, todo el ARN operón ribosómico es un gen. Sin embargo, a veces es más conveniente restringir el término *gen* al segmento del ARN que codifica un producto funcional, por ejemplo, una de las enzimas codificadas por el operón *lac*. El operón de la figura 21.25, en consecuencia, contiene ARNt y genes 16S, 23S y 5S. Las secuencias de ADN entre esos genes, aunque se transcriben, no se consideran parte de gen alguno.

13. La secuencia genómica de ADN proporciona una traducción exacta de la secuencia de ADN, como era de esperar. Sin embargo, al secuenciar un ARNt purificado se ve que muchos de los nucleótidos se han modificado en forma específica después de la transcripción. Lo mismo sucede en los eucariotas.

14. El gen de la triosa fosfato isomerasa en el maíz contiene unos 3 400 pares de bases. Si el espliceosoma se ensambla en el primer intrón, entonces quedan por transcribir 2 900 pares de bases. El tiempo requerido para transcribir 2 900 pares de bases es 97 segundos (2 900 nucleótidos ÷ 30 nucleótidos por segundo). Si el espliceosoma se ensambla de inmediato después de la transcripción del primer intrón, y si no puede iniciarse el corte y empalme hasta que se termine la transcripción de todo el gen, el espliceosoma debe ser estable durante al menos 97 segundos.

15. Es probable que el sitio de unión CRP-cAMP se traslape con el promotor del gen. Cuando se une CRP-AMP, el promotor se bloquea y no puede haber transcripción.

16. Cuando se altera la secuencia del sitio de corte 5′ o 3′, o el punto de ramificación, por mutación, no puede haber un corte correcto y no se puede producir ARNm funcional.

17. Sí. Una vez que la U2 snRNP se une al sitio de ramificación evitará que la U5 snRNP se una al aceptor del corte en 3′, e interferirá con el corte y empalme. Además, la deleción habrá eliminado una gran parte del tramo de pirimidina necesario para enlazarse al sitio de corte 3′. Ambas cosas evitarán un procesamiento correcto de ARNm y no se traducirá bien el ARN aberrante.

Capítulo 22
Síntesis de proteínas

1. Una hebra de ADN tiene tres marcos de lectura distintos que se traslapan, y en consecuencia un ADN de doble hebra tiene seis marcos de lectura. Eso se puede ver examinando la secuencia de ADN a partir del extremo 5′ de cada hebra y marcando los tripletes de codón. Eso identifica un marco de lectura en cada hebra. Ahora, partiendo del segundo nucleótido a partir de los extremos 5′ y marcando los tripletes de codón, se define el marco de lectura 2. El tercer marco de lectura en cada hebra comienza en el tercer nucleótido a partir de los extremos 5′. El "cuarto" marco de lectura es idéntico al primero; haga usted la prueba.

Mediante lógica similar se deduce que si el código genético fuese leído en codones de cuatro nucleótidos de longitud, entonces podría leerse una hebra de ADN en cuatro marcos de lectura diferentes, y por ello una pieza de doble hebra de ADN contendría ocho marcos de lectura (cuatro en cada hebra).

2. Cada secuencia de ARNm se podría traducir en tres marcos de lectura distintos. Para la primera secuencia de ARNm, los codones y las secuencias de polipéptidos posibles son

Marco de lectura 1 5′ ∿∿ C C G G C U A A G A U C U G A C U A G C ∿∿ 3′
— Pro — Ala — Lys — Ile PARO

Marco de lectura 2 5′ ∿∿ C C G G C U A A G A U C U G A C U A G C ∿∿ 3′
— Ala — Leu — Arg — Ser — Asp PARO

Marco de lectura 3 5′ ∿∿ C C G G C U A A G A U C U G A C U A G C ∿∿ 3′
— Gly PARO

Para la segunda secuencia de ARNm, los codones y secuencias de polipéptidos posibles son

Marco de lectura 1 5′ ∿∿ G C U A G U C A G A U C U U A G C C G G ∿∿ 3′
— Ala — Ser — Gln — Ile — Leu — Ala — Gly —

Marco de lectura 2 5′ ∿∿ G C U A G U C A G A U C U U A G C C G G ∿∿ 3′
— Leu — Val — Arg — Ser PARO

Marco de lectura 3 5′ ∿∿ G C U A G U C A G A U C U U A G C C G G ∿∿ 3′
PARO

Como sólo un marco de lectura sin codón de paro puede codificar un polipéptido, la segunda secuencia de ARNm corresponde al transcrito real. La secuencia del polipéptido codificado es –Ala–Ser–Gln–Ile–Leu–Ala–Gly–.

3. Se hidrolizan dos enlaces de fosfoanhídrido por cada aminoácido activado por una aminoacil-ARNt sintetasa.

$$\text{Aminoácido} + \text{ARNt} + \text{ATP} \longrightarrow \text{Aminoacil-ARNt} + \text{AMP} + \text{PP}_i$$

$$\text{PP}_i + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow 2\ \text{P}_i$$

El resto de la energía necesaria para sintetizar la proteína proviene de la hidrólisis del GTP: se hidroliza un enlace de alta energía en la formación del complejo de inicio 70S, otro durante la inserción de cada aminoacil-ARNt al sitio A del ribosoma y otra en cada paso de traslocación. Ya que la metionil-ARNt inicial se inserta en el sitio P, suceden 599 inserciones nuevas y 599 traslocaciones durante la síntesis de una proteína con 600 residuos. Por último, se hidroliza un enlace de fosfoanhídrido durante la liberación de la cadena terminada de polipéptido del ribosoma. La cantidad total de enlaces de fosfoanhídrido hidrolizados durante la síntesis de la proteína es

Activación (600 × 2)	1200
Inicio	1
Inserción	599
Traslocación	599
Terminación	1
Total	2400

4. La respuesta depende del marco de referencia. Por ejemplo, en relación con el ribosoma, el ARNm y los dos ARNt se traslocan por un codón triplete. En relación con el ARNm, el ribosoma es el que se desplaza por tres nucleótidos.

5. La región de la molécula de ARNm antes del codón verdadero de inicio contiene la secuencia de Shine-Dalgarno, rica en purina, que es complementaria a una secuencia rica en pirimidina en el extremo 3′ del componente 16S ARNr de la subunidad ribosómica 30S (figura 22.17). Si se posiciona en forma correcta la subunidad 30S en el ARNm transcrito, la secuencia de Shine-Dalgarno permite que fMet-$ARNt_f^{Met}$ se una al codón de inicio. Una vez que se inicia la síntesis de la proteína, todos los codones siguientes de metionina son reconocidos por Met-$ARNt^{Met}$.

6. No, porque un inicio correcto de traducción en *E. coli* requiere que una secuencia de Shine-Dalgarno esté en la región no traducida 5′ del ARNm. Ya que los ribosomas eucariotas no tienen este requisito, es extremadamente improbable que un ARNm de una planta contenga, en forma fortuita, una secuencia de Shine-Dalgarno en el lugar correcto.

Sin embargo, si la parte del gen que codifica el ARNm de planta se fundiera con una secuencia bacteriana de Shine-Dalgarno, entonces el marco de lectura abierto para la proteína vegetal se traduciría en forma correcta en la célula bacteriana.

7. El transcrito de cada gen de ARNr es una molécula de ARNr que se incorpora en forma directa a un ribosoma. Así, se necesitan varias copias de genes de ARNr para ensamblar la gran cantidad de ribosomas que requiere la célula. En contraste, el transcrito de cada gen de proteína ribosómica es ARNm que se puede traducir muchas veces. Debido a esta amplificación de ARN a proteína, se necesitan menos genes para cada proteína ribosómica que para ARNr.

8. Entre las posibles especies de ARNt supresor están todas las que reconocen codones que difieren de UAG en un solo nucleótido, esto es, los ARNt cuyos anticodones difieren en un solo nucleótido de la secuencia CUA, que es complementaria al codón de paro UAG. $ARNt^{Gln}$, $ARNt^{Lys}$ y $ARNt^{Gln}$ todas reconocen a los codones que difieren sólo en la primera posición (codones CAG, AAG y GAG, respectivamente). El $ARNt^{Leu}$, $ARNt^{Ser}$ y $ARNt^{Trp}$ reconocen codones que sólo difieren en la segunda posición (UUG, UCG y UGG, respectivamente). El $ARNt^{Tyr}$ reconoce codones que sólo difieren en la tercera posición (UAU o UAC).
Una célula que contenga un ARNt supresor puede sobrevivir a pesar de la pérdida de un ARNt normal, porque la célula contiene también moléculas de ARNt isoaceptoras, que llevan el mismo amionácido. Aunque el ARNt supresor puede insertar a veces un aminoácido en un codón que se presenta normalmente, la proteína resultante, que es más grande que el producto genético normal, no suele ser letal para la célula. De hecho, las cepas de *E. coli* que contienen ARNt supresor sí sobreviven, pero con frecuencia no son tan saludables como las cepas silvestres.

9. a) Aminoacil-ARNt sintetasas, las enzimas que se unen a ARNt y catalizan la aminoacilación.
b) IF-2 en bacterias y eIF-2 en eucariotas, una proteína que se une al ARNt de inicio aminoacilado y lo carga en el sitio P del ribosoma durante el inicio de la traducción.
c) EF-Tu en bacterias y EF-1α en eucariotas, una proteína que se une a ARNt cargado y los carga al sitio A del ribosoma durante el alargamiento del polipéptido.
d) Ribosomas. Estos grandes complejos de ARN y proteína contienen dos sitios que se pueden unir en forma específica a los ARNt: el sitio A y el sitio P.
e) Los ARNm-ARNt se unen a ARNm por puentes de hidrógeno entre codón y anticodón.
Las enzimas que modifican residuos específicos en ARNt individuales durante el proceso de maduración también pueden ser capaces de unirse a ARNt.

10. Bajo circunstancias normales, cuando la maquinaria de traducción encuentra UGA en RF-2 ARNm, el factor RF-2 reconoce al codón de paro y termina la síntesis de la proteína. Sin embargo, cuando es baja la concentración de RF-2 celular, el ribosoma hace una pausa en el codón de terminación, desplaza el marco y continúa traduciendo el RF-2 ARNm para producir la proteína con longitud total. Así, la presencia del codón de paro promueve el desplazamiento de marco en traducción, en ausencia del RF-2, y permite que el RF-2 regule su propia producción.

11. a) Si se eliminara toda la región líder, no sería posible la atenuación, y la transcripción estaría controlada sólo por el represor *trp*. Aumentaría la velocidad total de transcripción del operón *trp*.
b) Si se eliminara la región que codifica al péptido líder, la transcripción estaría controlada sólo por el represor *trp*. La eliminación de la secuencia que codifica al péptido líder eliminaría la secuencia 1, permitiendo así la formación de la horquilla 2-3 estable. Ya que ni el sitio de pausa (horquilla 1-2) ni el terminador (horquilla 3-4) se podrían formar, los transcritos iniciales siempre podrían continuar en el operón *trp*.

c) Si la región líder no tuviera codón AUG, el operón casi nunca se transcribiría. Por la ausencia del codón de inicio no se sintetizaría el péptido líder, y casi siempre se formarían las horquillas 1-2 y 3-4, causando la terminación de la transcripción.

12. No, es difícil de imaginar. Una de las propiedades importantes del modelo de atenuación es que uno o más codones en el péptido líder suelen codificar el aminoácido que sintetiza ese operón. Es la carencia o abundancia relativa de determinados ARNt aminoacilados lo que modula la atenuación. Los productos del operón *lac* no intervienen en forma directa en la síntesis de aminoácidos, por lo que no cabe esperar que varíen las concentraciones celulares de una clase de ARNt aminoacilados con la actividad del operón.

13. La presencia de codones que especifican la valina y la leucina en las regiones líderes de los operones de isoleucina parece indicar que una escasez de estos aminoácidos promovería la transcripción de los genes para la biosíntesis de la isoleucina. También se requieren muchas de las enzimas necesarias para sintetizar la isoleucina en las rutas de la valina y de la leucina (sección 18.5a). Así, aun cuando la concentración de la isoleucina sea alta, una baja concentración de la valina asegura que la transcripción del operón isoleucina no termine en forma prematura.

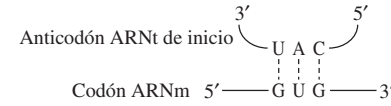
14. Cuando la proteína recién sintetizada se extruye del ribosoma, el péptido señal *N*-terminal es reconocido y unido por una partícula de reconocimiento de señal (SRP). Se inhibe más traducción hasta que la SRP se una a su receptor en la cara citosólica del retículo endoplasmático. Las riboforinas anclan al ribosoma en el retículo endoplasmático. Cuando se reanuda la traducción, la cadena de polipéptidos pasa por un poro hacia el lumen. Si el polipéptido no pasa por completo a través de la membrana, el resultado es una proteína integral en la membrana, con su *N*-terminal en el lumen del retículo endoplasmático y su C-erminal en el citosol.

La glicosilación de residuos específicos se efectúa en el lumen del retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi. La proteína, todavía incrustada en la membrana, es transportada entre el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, en vesículas de transferencia que forman una yema y se desprenden del retículo endoplasmático.

Las vesículas secretoras transportan a la proteína totalmente glicosilada del aparato de Golgi a la membrana plasmática. Cuando las vesículas se funden con esa membrana, la parte *N*-terminal de la proteína, que estaba en el lumen, queda ahora expuesta al espacio extracelular, y la parte *C*-terminal permanece en el citosol.

15. Sí. Una secuencia de señal de secreción hidrofóbica ubicada en el *N*-terminal de una proteína es necesaria y suficiente para entrar a la ruta de secreción celular.

16. El anticodón de ARNt de inicio se aparea con GUG formando un par de bases G/U entre el nucleótido en posición 5′ del codón y la posición 3′ del anticodón.



Esta interacción no se relaciona con el tambaleo, porque la posición 5′ del anticodón es la posición de tambaleo.

Capítulo 23
Tecnología del ADN recombinante

1. Sólo las células que han absorbido plásmidos intactos forman colonias, porque las células no transformadas son sensibles a la tetraciclina. Hay dos clases de plásmidos: pBR322 intacto formado por ligazón de los extremos que cortó *Pst*I, y una molécula recombinante formada por inserción del fragmento de restricción *Pst*I en el vector. Las células que contienen el vector intacto son resistentes a la ampicilina, en tanto que las que contienen al recombinante son sensibles a ella, ya que el sitio *Pst*I está dentro del gen amp^R (figura 23.3). Se pueden diferenciar estos dos tipos celulares transfiriendo parte de las colonias a otra placa de Petri con un medio que contenga ampicilina. Las células de colonias que no pueden crecer en presencia de ampicilina contienen al plásmido recombinante.

2. Las células transformadas que crecen en ausencia de leucina deben contener un fragmento de ADN de levadura que codifique la versión de la β-isopropilato deshidrogenasa de levadura. Las células de *E. coli* pueden producir una versión funcional de esta enzima de levadura, lo que parece indicar que los genes de la levadura y de *E. coli* se conservaron en la evolución. Además, el gen de la levadura no debe contener intrones, porque en las bacterias no se pueden procesar los ARNm precursores que contienen intrón. (El gen de levadura *LEU*2, descrito en la sección 23.3B, fue clonado por primera vez de este modo. La técnica se llama clonación por complementación).

3. Sí. De hecho este fue el método con que se identificaron elementos ARS en el primer lugar.

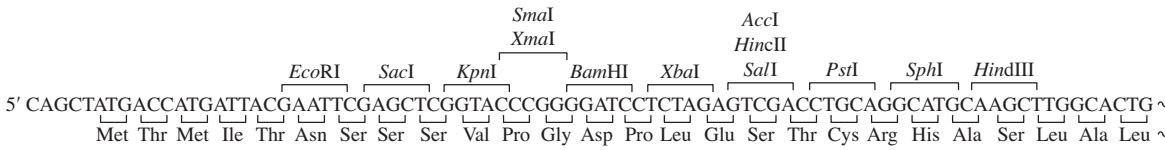
4. Usando la ecuación 23.1, $P = 0.99$ y

$$n = \frac{300 \text{ kb}}{3.2 \times 10^6 \text{ kb}} \approx 10^{-4}$$

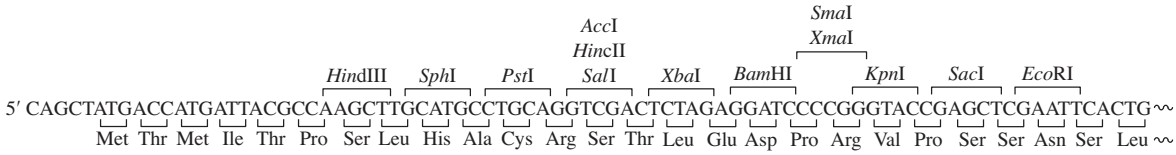
Entonces,

$$N = \frac{\ln(1 - 0.99)}{\ln(1 - 10^{-4})} = \frac{-4.6}{-10^{-4}} \approx 46\,000$$

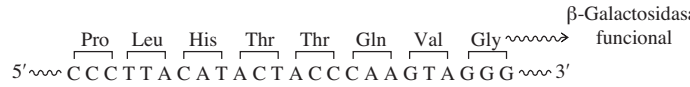
5. a)



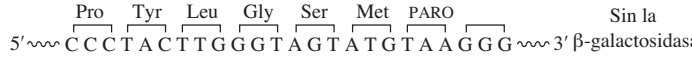
b)



6. El ADN sintético se inserta en el sitio *Sma*I en ambas orientaciones. En cualquier orientación se mantiene el marco de lectura del gen de la β-galactosidasa. En una orientación, el inserto se traduce y se produce la β-galactosidasa funcional. Las colonias producidas por esta ligazón son azules.



Sin embargo, en la dirección contraria un codón de paro (TAA) detiene la traducción del gen de la β-galactosidasa; las colonias producidas por esta ligazón son blancas.



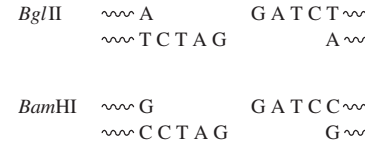
7. El gen pBR322 *rop* mantiene una cantidad de copias relativamente baja (unos 20 plásmidos por célula). Al inactivar la proteína Rop, la cantidad de copias del nuevo plásmido sería mucho mayor (varios cientos de plásmidos por célula). De hecho, muchos de los vectores comunes de clonación que se usan hoy no contienen el gen *rop* sólo por esta razón.

8. No. Siempre que se transforma un plásmido que lleva al promotor fuerte regulado P_R del bacteriófago λ en *E. coli* huésped que ya contiene un lisógeno λ integrado al cromosoma de *E. coli*, el ADN que llega titulará la proteína represora cI (recuérdese que la proteína represora λ mantiene con eficacia al profago λ en estado durmiente). Cuando la proteína represora cI se une a los sitios en el ADN plásmido de copias múltiples, el profago se inducirá y entrará a la ruta lítica. Esta ruta lítica lleva a la escisión, replicación, empacamiento en ADN del profago, y lisis final de *E. coli* huésped. Por consiguiente, todas las células que absorben el plásmido morirán antes de poder formar colonias.

9. Se debe escoger un sistema de expresión que pueda producir la proteína y adicionar las partes de carbohidrato a la proteína expresada. Como las bacterias carecen de las enzi-

mas que catalicen algunas de las modificaciones posteriores a la traducción, el sistema de expresión de levaduras sería una mejor elección.

10. Aunque los sitios de reconocimiento para *Bgl*II y *Bam*H1 difieren, las enzimas producen fragmentos con extremos cohesivos idénticos. Esos fragmentos pueden ligarse con tanta facilidad como los fragmentos producidos por una sola enzima.



11. El corte mecánico de ADN produce un surtido aleatorio de fragmentos, porque los cortes no se producen en el mismo lugar de cada molécula de ADN. En contraste, una endonucleasa de restricción produce una población de fragmentos con longitudes iguales a las distancias entre sitios de restricción. Dependiendo de la ubicación de los sitios de restricción, puede ser que esos fragmentos sean demasiado grandes o demasiado pequeños para ser clonados, y puede ser que partes del genoma no estén representadas en la biblioteca. El corte de ADN supera esta dificultad. El corte también asegura que la biblioteca contenga fragmentos de ADN que se traslapen, haciendo posible efectuar un desplazamiento sobre el cromosoma.

12. Las células de *E. coli* que contienen un plásmido con una copia de toda la longitud del gen *Taq*I expresarán la enzima *Taq*I. La enzima se dividirá en todos sus sitios de reconocimiento en el cromosoma anfitrión y matará a la célula. Por consiguiente, será muy difícil encontrar colonias en este experimento que se hibriden con el subfragmento marcado del gen. Como se cortó el ADN genómico de *T. aquaticus*, podrá haber clones raros en la biblioteca que contengan fragmentos incompletos del gen, pero su uso será limitado en esos experimentos. Una forma de obtener un clon de longitud completa sería transformar células de *E. coli* que ya se hayan modificado genéticamente para expresar la Taq ADN metilasa.

13. Las enzimas de restricción presentes en las células huésped normales podrían romper moléculas recombinantes recién introducidas, haciendo imposible clonar ciertos fragmentos de ADN. Si se usa una cepa huésped que no forme endonucleasas de restricción se evita este problema.

Una mutación en RecA reduce la recombinación y evita así el rearreglo de moléculas de ADN recombinante durante la propagación en las células huésped. Con frecuencia, el rearreglo es un problema, en especial cuando los fragmentos de ADN clonado contienen secuencias repetitivas que pueden servir como sitios de recombinación homóloga.

14. Se usó el fragmento de ADN para sondear una biblioteca genómica de *Drosophila* con objeto de aislar fragmentos que se traslapen. Este proceso se repitió (un desplazamiento por el cromosoma) hasta que se alcanzaron los genes de *bitórax*. Fue el primer ejemplo de un desplazamiento por el cromosoma. El lector puede consultar algunos de los "trucos" que se usaron para resolver varios problemas técnicos (Bender, W., Spierer, P. y Hogness, D. S. (1983). Chromosomal walking and jumping to isolate DNA from the *ace* and *rosy* loci and the *bithorax* complex in *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.* 168:17-33).

15. Cuando un gen responsable de una enfermedad genética se vincula a determinado cromosoma, se puede clonar el gen por desplazamiento por el cromosoma desde un sitio cercano. Se pueden usar los EST como puntos de partida en los desplazamientos por el cromosoma. Además, como los EST representan genes expresados, en realidad pueden representar ADNc clonados del gen deseado.

16. No. No se amplificará el ADN de doble hebra si los ADN cebadores apuntan hacia afuera, en vez de hacia adentro, uno contra el otro. En cada ciclo de la reacción, los cebadores se unirán a sus sitios blanco, y la polimerasa hará una copia del ADN a cada lado de la región deseada. No habrá aumento de sitios de unión para los cebadores ni habrá amplificación exponencial.

17. Como el padre 1 es homocigoto y recibió una copia de ese lugar por parte de cada uno de sus padres, se puede deducir que cada abuelo contenía al menos una copia idéntica

del lugar. En otras palabras, los dos abuelos eran al menos heterocigotos en este lugar polimórfico. Se puede elaborar un argumento similar para demostrar que los otros dos abuelos fueron al menos heterocigotos para la otra copia de este lugar polimórfico.

18. Se podría usar la PCR para detectar el gen de la toxina Bt en el maíz. El ADN se extrae de una pequeña muestra del alimento. El método de detección en la PCR usa pares cebadores específicos para el gen de la toxina Bt. A continuación se analizan los productos de la PCR por electroforesis en busca del producto amplificado de la toxina Bt.

19. En este experimento se compararon la fidelidad de la replicación del ADN por parte de la *Taq* polimerasa de tipo silvestre y una *Taq* polimerasa mutante. Ambas enzimas se usaron para copiar un gen objetivo. Los productos de la reacción de PCR se secuenciaron entonces para determinar si contenían el orden original del gen objetivo, o si en los productos de la PCR había bases mal incorporadas que causaran mutaciones en la secuencia del ADN. Los resultados demuestran que el tipo silvestre no tuvo mutaciones en 20 clones, que 5 de los clones contuvieron 1 mutación y que dos clones tuvieron 2 mutaciones en el producto genético. Cuando se secuenciaron los productos de la polimerasa mutante, se encontraron más mutaciones en los clones. Sólo 6 clones no tuvieron mutaciones, en tanto que 5 clones tuvieron 6 mutaciones. Por consiguiente, la polimerasa mutante tuvo menor fidelidad de replicación del ADN en comparación con el tipo silvestre, porque hubo más mutaciones en los productos de la PCR de la *Taq* polimerasa mutante en comparación con la enzima de tipo silvestre. La *Taq* polimerasa mutante no se debería usar más en otros estudios.

Créditos de ilustraciones y fotografías

Capítulo 1 Pág. 2 (sup.) Wikimedia Commons. **Pág. 2 (inf.)** Wikimedia Commons. **Pág 3** Wikimedia Commons. **Pág. 15** Wikimedia Commons.

Capítulo 2 Pág. 40 Edgar Fahs Smith Memorial Collection.

Capítulo 3 Pág. 70 Bio.Rad. Se obtuvo permiso para usar la imagen de Bio.Rad Laboratories, Inc. Este permiso sólo es para incluirla en la edición 2006 de *Principles of Biochemistry,* 4/E por Horton *et al*. **Pág. 77** Wikimedia Commons.

Capítulo 4 Portada Photo Researchers, Inc. **Pág. 85** © Instituto suizo de bioinformática, Ginebra, Suiza, www.expasy.org/ch2d/. **Pág. 88 (inf.)** Getty Images Inc.-Hulton Archive Photos. **Pág. 92** Wikimedia Commons. **Pág. 109** Wikimedia Commons.

Capítulo 5 Pág. 136 (izq.) University of Toronto Archives and Records Management Services, Ref. Neg. No. 94.37-. 1. Reproducción de la fotografía en el folleto titulado "Maud Lenora Menten 1879-1960" publicado por la Canadian Biochemical Society [1979]. **Pág. 136 (der.)** Cortesía de Rockefeller University Archives.

Capítulo 8 Portada Wikimedia Commons.

Capítulo 9 Pág. 259, Visuals Unlimited. **Pág. 274** H. Larry Scott. **Pág. 283** M. M. Perry. **Pág. 284** Wikimedia Commons.

Capítulo 10 Portada © 1985 Robert A. Tyrell. **Pág. 307 (sup.)** Photo-take NYC. **Pág. 307 (inf.)** Visuals Unlimited.

Capítulo 11 Pág. 327 Barton W. Spear. **Pág. 329 (izq.)** Wikimedia Commons. **Pág. 329 (der.)** © Bettman/CORBIS.

Capítulo 12 Pág. 371 Photo Researchers, Inc. **Pág. 374** Lisa A. Shoemaker.

Capítulo 13 Pág. 389, Suministrada por el Dr. Z. Hong Zhou con autorización del editor [Zhou, Z.H. *et al*. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, Págs. 14802-14807]; **Pág. 390(a) y (b)**, Suministrada por el Dr. Z. Hong Zhou con autorización del editor [Zhou, Z.H. *et al*. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98. Págs. 14802-14807]. University of Texas Medical School at Houston

Capítulo 14 Portada © www.stevebloom.com. **Pág. 417 (sup. e inf.)** Lisa A. Shoemaker.

Capítulo 15 Portada Mary Ginsburg. **Pág. 445** Arizona State University. Plant Bio Dept. Arizona State University, Dept. of Plant Biology and Center for the Study of Early Events in Photosynthesis, Tempe, AZ, Wim Vermaas, wim@asu.edu. **Pág. 447** Wikimedia Commons. **Pág. 460** Michelle Liberton, Howard Berg y Himadri Pakrasi, del Donald Danforth Plant Science Center y de Washington University, St. Louis. **Pág. 462 (sup. e inf.)** Lisa A. Shoemaker. **Pág. 464** Lisa A. Shoemaker. **Pág. 473** John Innes Centre. *Cell,* Vol. 60, No. 1, 1990, pp 115.122, Bhattacharyya *et al*, "The wrinkled seed..." sólo la fotografía.

Capítulo 16 Portada © CORBIS.

Capítulo 17 Pág. 522 Phototake NYC.

Capítulo 19 Pág. 584, A. Harrington Brown/Science Source/Photo Researchers, Inc. **Pág. 593** Lisa A. Shoemaker. **Pág. 594** Lisa A. Shoemaker. **Pág. 600** Lisa A. Shoemaker. **Pág. 601** Lisa A. Shoemaker. **Pág. 602** Lisa A. Shoemaker. **Pág. 603** Lisa A. Shoemaker. **Pág. 604 (izq. y der)** Lisa A. Shoemaker. **Pág. 611** Lisa A. Shoemaker.

Capítulo 20 Portada Lisa A. Shoemaker. **Pág. 616** Lisa A. Shoemaker. **Pág. 617 (sup.)** Lisa A. Shoemaker. **Pág. 617 (inf.)** Dr. John Cairns. **Pág. 618** David S. Hogness. **Págs. 619, 623, 625, 628, 629, 633, 636, 637, 638, 640, 641, 642 (izq.)** Lisa A. Shoemaker. **Pág. 642 (der.)** Cortesía de la Regional Oral History Office, The Bancroft Library, University of California, Berkeley. **Pág. 643** Vanderbilt University.

Capítulo 21 Pág. 648 Cold Spring Harbor Laboratory Archives. **Pág. 649** © UPI/CORBIS-BETTMANN. **Pág. 650** American Association for the Advancement of Science. Reproducida con permiso de Murakami *et al*., *Science* 296: 1285.1290 (2002) Fig5A **(izq.)** American Association for the Advancement of Science. **Pág. 652** Oscar L. Miller, Jr., University of Virginia. Cortesía de American Society for Microbiology Journals Division del *Journal of Bacteriology,* vol., 171, Pág. 4209, Figura 2 (b). **Págs. 657, 659, 662, 664, 667, 669, 670, 671, 676, 678** Lisa A. Shoemaker.

Capítulo 22 Pág. 694 Stanford U. School Of Medicine. Approaching translation at atomic resolution Joseph D. Puglisi *et al*. *Nature Structural Biology 1,* 855-861 (2000). **Pág. 695** Lisa A. Shoemaker. **Pág. 698** Lisa A. Shoemaker. **Pág. 699** Oscar L. Miller, Jr., University of Virginia. **Págs. 701, 702, 704, 713** Lisa A. Shoemaker. **Pág. 714** H. H. Mollenhauer. **Pág. 715** Lisa A. Shoemaker.

Capítulo 23 Portada Purdue University Dept. of Entomology **Pág. 728** Philip Lo Carl y Kevin Jo Cournoyer. **Págs. 730, 732** Lisa A. Shoemaker. **Pág. 736** Cortesía del Dr. Ralph L. Brinster, School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania. **Pág. 738 (izq.)** Lisa A. Shoemaker. **Pág. 738 (der.)** D. R. Helinski. De Ow, D. W., Wood, K. V., Deluca, M., de Wet, J. R., Helinski, D. R., y Howell, S. H. (1986). Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* 234: 856.859. © 1986 by the American Association for the Advancement of Science. **Pág. 738 (inf.)** De Fischhoff, D. A., Bowdish, K. S., Perlak, F. J., Marrone. P. G., McCormick, S. M., Niedermeyer, J. G., Dean, D. A., Kusano-Kretzmer, K., Mayer, E. J., Rochester, D. E., Rogers, S. G. y Fraley, R. T. (1987). **Pág. 740** Lisa A. Shoemaker. **Pág. 743** Wikimedia Commons. **Pág. 744** Lisa A. Shoemaker.

Preliminares Pág. xxxiii, Wikimedia Commons.

Contenido Pág. xv, Carolina Biological/Visuals Unlimited; **Pág. xvii**, Lisa A. Shoemaker; **Pág. xx**, Carolina Biological Supply Company/Phototake NYC; **Pág. xxiv**, D.R. Helinski, De Ow, D.W., Wood, K.V., Deluca, M., de Wet, J.R., Helinski, D.R. y Howell, S.H. (1986). Expresión pasajera y estable del gen de luciferasa de luciérnaga en células de plantas y plantas transgénicas. Science 234: 856-859. © 1986 por la American Association for the Advancement of Science.

Glosario de términos bioquímicos

aceleración de velocidad. La relación de la constante de velocidad para una reacción en presencia de una enzima (k_{cat}) dividida entre la constante de velocidad para esa reacción en la ausencia de la enzima (k_n). El valor de la velocidad de aceleración es una medida de la eficiencia de una enzima.

ácido. Una sustancia que puede donar protones. Un ácido se convierte en su base conjugada por la pérdida de un protón. (La teoría de Lewis define un ácido como un aceptor de un par de electrones [ácido de Lewis]).

ácido anhídrido. El producto formado por la condensación de dos moléculas de ácido.

ácido conjugado. Producto resultante de la ganancia de un protón por una base.

ácido desoxirribonucleico (ADN). Polímero compuesto por residuos de desoxirribonucléotido unidos por enlaces 3′–5′ fosfodiéster.

ácido graso. Una cadena larga de hidrocarburos alifáticos con un solo grupo carboxilo en un extremo. Los ácidos grasos son el tipo más sencillo de lípido, y son componentes de lípidos mucho más complejos, incluyendo los triacilgliceroles, los glicerofosfolípidos, los esfingolípidos y las ceras.

ácido graso esencial. Ácido graso que no puede sintetizar el organismo de un animal y se debe obtener de la alimentación.

ácido graso insaturado. Ácido graso con al menos un enlace doble de carbono-carbono. Un ácido graso insaturado con sólo un enlace doble carbono-carbono se denomina ácido graso monoinsaturado. Un ácido graso con dos enlaces dobles de carbono-carbono se denomina ácido graso poliinsaturado. En general, los enlaces dobles de los ácidos grasos insaturados son de configuración *cis* y se separan unos de otros mediante grupos metileno (—CH_2—).

ácido graso saturado. Ácido graso que no contiene un enlace doble carbono-carbono.

ácido nucleico. Polímero compuesto por residuos de nucleótido unidos en una secuencia lineal por medio de enlaces 3′–5′ fosfodiéster. El ADN y ARN son ácidos nucleicos compuestos por residuos de desoxirribonucleótido y residuos de ribonucleótido, respectivamente.

ácido ribonucleico (ARN). Polímero que consiste en residuos ribonucleótidos unidos por enlaces 3′–5′ fosfodiéster. La división del azúcar en el ARN es ribosa. La información genética contenida en el ADN se transcribe en la síntesis de ARN, parte de la cual (ARNm) es traducida en la síntesis de proteínas.

ácido ribonucleico de transferencia. Ver ARNt.

ácido ribonucleico mensajero. Ver ARNm.

ácido ribonucleico ribosomal (ARNr). Tipo de moléculas de ARN que es un componente integral de los ribosomas. El ARN ribosomal es el ARN celular más abundante.

acidosis. Enfermedad en la cual el pH de la sangre está muy por debajo de 7.4.

ACP. Ver proteína portadora de acilo.

activación de la prealimentación. Activación de una enzima en una ruta metabólica mediante un metabolito producido en la ruta con anterioridad.

activador. Ver activador transcripcional.

activador transcripcional. Proteína reguladora de unión de ADN que mejora la velocidad de transcripción al incrementar la actividad del ARN polimerasa en promotores específicos.

adenilato. Ver adenosín monofosfato.

adenosín difosfato (ADP). Un ribonucleósido difosfato en el cual dos grupos fosforilo están enlazados de manera sucesiva al átomo de oxígeno 5′ de la adenosina. El ADP se forma en reacciones en las cuales un grupo fosforilo es transferido del adenosín trifosfato (ATP) o al adenosín monofosfato (AMP).

adenosín monofosfato (AMP). Un ribonucleósido monofosfato en el cual un grupo fosforilo se une al átomo de oxígeno 5′ del adenosín. La fosforilación de AMP produce adenosina difosfato (ADP), un precursor del adenosina trifosfato (ATP). También llamado adenilato.

adenosín trifosfato (ATP). Un ribonucleósido trifosfato en el cual tres grupos fosforilo están enlazados sucesivamente al átomo de oxígeno 5′ de la adenosina. Los enlaces fosfoanhídrido del ATP contienen una energía química potencial considerable. Al donar los grupos fosforilo, el ATP puede transferir esa energía a los intermediarios que después participan en las reacciones biosintéticas.

adipocito. Célula de almacenaje del triacilglicerol que se encuentra en los animales. Un adipocito está compuesto por una gota de grasa rodeada por una delgada cubierta de citosol en la cual el núcleo y otros organelos están suspendidos.

A-ADN. La conformación de ADN que por lo común se observa cuando el ADN purificado se deshidrata. A-ADN es una doble hélice dextrógira que contiene aproximadamente 11 pares de bases por vuelta de hélice.

ADN. Ver ácido desoxirribonucleico.

ADN basura. Regiones del genoma sin alguna función conocida.

ADNc. ADN complementario.

ADN circular. Molécula de ADN en la cual dos extremos comparativos están unidos covalentemente mediante enlaces 3′– 5′ fosfodiéster, formando un círculo cerrado.

ADN complementario (ADNc). ADN sintetizado a partir de un molde de ARNm por medio de la acción de la transcriptasa inversa.

ADN conectador. El segmento del ADN (aproximadamente 54 pares de bases) entre dos partículas centrales de nucleosomas adyacentes.

ADN girasa. Ver topoisomerasa.

ADN inserto. Fragmento de ADN transportado por un vector de clonación.

ADN ligasa. Enzima que une dos polinucleótidos de ADN mediante la catalización de la formación de un enlace fosfodiéster. La ADN ligasa también puede reparar huecos en el ADN de doble hebra.

ADN polimerasa. Enzima que cataliza la adición de residuos de desoxirribonucléotido al extremo 3′ de una hebra de ADN.

ADN recombinante. Una molécula de ADN que incluye el ADN de diferentes fuentes.

ADP. Ver adenosín difosfato.

aeróbico. Que ocurre en la presencia del oxígeno.

aerobio obligado. Organismo que requiere la presencia de oxígeno para su supervivencia.

agente caotrópico. Sustancia que mejora la solubilidad de compuestos no polares en el agua al desestabilizar las regularidades en el enlace por puente de hidrógeno entre las moléculas de agua. Las disoluciones concentradas de agentes caotrópicos, como las sales de urea y guanidinio, disminuyen el efecto hidrofóbico y por lo tanto son desnaturalizadores efectivos de las proteínas.

agente de desacoplamiento. Compuesto que interrumpe la unión estrecha acostumbrada entre el transporte de electrones y la fosforilación del ADP.

agente de intercalado. Compuesto que contiene una estructura anular plana que se puede ajustar entre los pares de base apilados de ADN. Los agentes de intercalado distorsionan la estructura de ADN, ya que desenrollan parcialmente la doble hélice.

agente oxidante. Sustancia que acepta electrones en una reacción de oxidación-reducción y por lo tanto se reduce.

agente reductor. Sustancia que pierde electrones en una reacción de oxidación-reducción y por lo tanto se oxida.

aglicón (genina). Molécula orgánica, como un alcohol, una amina, o un tiol, que forma un enlace glucosídico con el carbono anomérico de una molécula de azúcar para formar un glucósido.

ajuste inducido. Modelo para la activación de una enzima mediante un cambio de adaptación iniciado por sustrato.

alarmona. Nucleótido de señal que se acumula durante el estrés metabólico en las procariotas.

alcalosis. Condición en la cual el pH de la sangre es significativamente mayor que 7.4.

aldimina. Ver base de Schiff.

aldosas. Tipo de monosacárido en el cual el átomo de carbono más oxidado, designado como C-1, es aldehídico.

almidón. Homopolímero de residuos de glucosa que constituye un almacén de polisacáridos en las plantas. Existen dos tipos de almidones: amilosa, un polímero sin ramificaciones de residuos de glucosa unido por enlaces α-(1 → 4); y la amilopectina, un polímero ramificado de residuos de glucosa unidos por enlaces α-(1 → 4) con enlaces α-(1 → 6) en los puntos de ramificación.

aminoácido. Ácido orgánico compuesto por un átomo de carbono α al cual se unen un grupo amino, un grupo carboxilato, un átomo de hidrógeno y una cadena lateral específica (grupo R). Los aminoácidos son los elementos fundamentales de las proteínas.

aminoácido esencial. Aminoácido que un animal no puede sintetizar y debe obtenerse de la alimentación.

aminoácido no esencial. Aminoácido que puede producir un animal en cantidad suficiente para satisfacer sus necesidades metabólicas.

aminoacil-ARNt. Molécula de ARNt que contiene un aminoácido unido de modo covalente al residuo de 3′-adenilato del tallo aceptor.

amino-terminal. Ver *N*-terminal.

amortiguador. Una disolución de un ácido y su base conjugada que resiste cambios en el pH.

AMP. Ver adenosín monofosfato.

anaeróbica. Ocurre en ausencia del oxígeno.

anaerobio obligado. Organismo que requiere un entorno libre de oxígeno para su supervivencia.

anaerobios facultativos. Organismo que puede sobrevivir en presencia o ausencia de oxígeno.

análisis de aminoácidos. Un procedimiento cromatográfico utilizado para la separación y cuantificación de los aminoácidos de disoluciones como los hidrolisatos de proteínas.

análogo de estado de transición. Compuesto parecido a un estado de transición. Los análogos de estados de transición se unen de manera peculiar y con extremada firmeza a los sitios activos de las enzimas apropiadas y por lo tanto actúan como potentes inhibidores.

ancla de GPI a la membrana. Estructura fosfatidilinositol glicano unida a una proteína por medio de un residuo de fosfoetanolamina. Las mitades de acil graso del ancla de GPI están insertas en la bicapa lipídica, y por lo tanto atan la proteína a la membrana.

angstrom (Å). Unidad de longitud igual a 1×10^{-10}m, o 0.1 nm.

anhídrido. Ver ácido anhídrido.

animales. Uno de los cinco reinos de la vida. Los animales son multicelulares, diploides, eucariotas que producen huevos haploides y esperma. Los animales más comunes son los gusanos, moluscos, insectos, peces y mamíferos.

anión. Ion con una carga negativa neta.

ánodo. Un electrodo con carga positiva. En la electroforesis, los aniones se mueven hacia el ánodo.

anómeros. Los isómeros de una molécula de azúcar que tienen diferentes configuraciones sólo en el átomo de carbono anomérico.

antibiótico. Compuesto producido por un organismo, que es tóxico para otros organismos. Desde el punto de vista clínico los antibióticos útiles deben ser específicos para ciertos patógenos y no afectar al anfitrión humano.

anticodón. Secuencia de tres nucleótidos en el lazo anticodón de una molécula de ARNt. El anticodón se une al codón complementario en el ARNm durante la traducción.

anticuerpo. Glucoproteína sintetizada por ciertos glóbulos blancos como parte del sistema de defensa inmunológico. Los anticuerpos se unen específicamente a compuestos foráneos, llamados antígenos, y con ello conforman complejos de anticuerpos que disponen al antígeno para la destrucción. También se conoce como inmunoglobulina.

anticuerpos catalíticos. Anticuerpos que han sido manipulados genéticamente de manera que catalizan reacciones que involucran el antígeno.

antígeno. Molécula a la que se le une específicamente un anticuerpo.

antipuerto. El cotransporte de dos especies diferentes de iones o moléculas en direcciones opuestas a través de una membrana mediante una proteína transportadora.

aparato de Golgi. Complejo de sacos membranosos, aplanados y rellenos de fluidos en las células eucarióticas. Se encuentran muchas veces en proximidad al retículo endoplásmico. El aparato de Golgi está implicado en la modificación, clasificación y reconocimiento de proteínas.

apareamiento de bases. Interacción entre las bases de los nucleótidos en los ácidos nucleicos de hebra única para formar moléculas de doble hebra, como el ADN, o regiones de estructura secundaria de doble hebra. Los pares de bases más comunes son los que están unidos por puentes de hidrógeno entre la adenina (A) y la timina (T) o el uracilo (U), y la guanina (G) con la citosina (C).

apoproteína. Proteína cuyo cofactor(es) está ausente. Sin el cofactor, la apoproteína carece de la actividad biológica característica de la holoproteína correspondiente.

apoptosis. Muerte programada de una célula.

atenuación. Mecanismo de regulación de la expresión genética que combina la traducción y la transcripción. Por lo general, la traducción de un marco de lectura corto al principio de un operón de procariota determinará si la transcripción termina antes de que el resto del operón se transcriba.

ARN. Ver ácido ribonucleico.

ARN antisentido. Molécula de ARN que se une a una molécula de ARNm que es complementaria, con lo que forma una región de doble hebra que inhibe la traducción del ARNm.

ARN pequeño. Tipo de molécula de ARN. Algunas pequeñas moléculas de ARN tienen una actividad catalítica. Otras moléculas pequeñas de ARN son componentes de pequeñas ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs).

ARNm. Tipo de moléculas de ARN que sirve como molde para la síntesis de proteínas.

ARNm monocistrónico. Molécula de ARNm que codifica sólo un polipéptido individual. La mayoría de moléculas eucarióticas de ARNm son monocistrónicas.

ARNm policistrónico. Molécula de ARNm que contiene múltiples regiones codificantes. Muchas moléculas procariotas ARNm son policistrónicas.

ARNr. Ver ácido ribonucleico ribosomal.

ARNt. Un tipo de moléculas de ARN que portan aminoácidos activados al sitio de síntesis de proteínas para su incorporación en cadenas peptídicas crecientes. Las moléculas de ARNt contienen una anticodón que reconoce un codón complementario en ARNm.

ARNt-iniciador. La molécula de ARNt que se utiliza exclusivamente en los codones de iniciación. El ARNt-iniciador por lo general es un metionil-ARNt específico.

átomo proquiral. Átomo con múltiples sustituyentes, dos de los cuales son idénticos. Un átomo proquiral puede convertirse en quiral cuando uno de los sustituyentes idénticos se reemplaza.

átomo quiral. Átomo con sustitución asimétrica que puede existir en dos diferentes configuraciones.

ATP. Ver adenosín trifosfato.

ATPasa. Enzima que cataliza la hidrólisis del ATP en ADP + P_i. Las ATPasas transportadoras de iones utilizan la energía del ATP para transportar Na+, K+ o Ca2+ a través de una membrana celular.

autofosforilación. Fosforilación de una proteína cinasa catalizada por otra molécula de la misma cinasa.

autosoma. Cromosoma diferente al cromosoma sexual.

autótrofo. Organismo que puede crecer y reproducirse sólo mediante sustancias inorgánicas (como el CO_2) como única fuente de elementos esenciales.

bacteria entérica. Bacterias que habitan en el intestino grueso de los animales.

bacteriófago. Virus que infecta a una bacteria o a una célula bacteriana.

base. **1**. Sustancia que puede aceptar protones. Una base se convierte en su ácido conjugado por la adición de un protón. (La teoría de Lewis define a la base como un donador de pares de electrones [base de Lewis]). **2**. La purina o pirimidina sustituidas en un nucleósido o nucleótido. Las bases heterocíclicas de nucleósidos y nucleótidos pueden participar en la unión del hidrógeno.

base conjugada. Producto resultante de la pérdida del protón por un ácido.

base de Schiff. Complejo formado por la condensación reversible de una amina primaria con un aldehído (para formar aldimina) o una cetona (para formarse una cetimina).

B-ADN. La conformación más común de ADN y la propuesta por Watson y Crick. El B-ADN es la doble hélice dextrógira con un diámetro de 2.37 nm y aproximadamente 10.4 pares de bases por giro de hélice.

bicapa lipídica. Doble capa de lípidos en la cual las colas hidrofóbicas se asocian entre sí en el interior de la bicapa y los grupos de la cabeza polar miran hacia el exterior en un entorno acuoso. Las bicapas lipídicas son bases estructurales de membranas biológicas.

bilis. Suspensión de sales biliares, pigmentos biliares y colesterol que se origina en el hígado y se almacena en la vesícula biliar. La bilis se secreta en el intestino delgado durante la digestión.

bioenergética. Estudio de los cambios energéticos en los sistemas biológicos.

biopolímero. Macromolécula biológica en la cual muchas pequeñas moléculas similares o idénticas están unidas covalentemente entre sí para formar una larga cadena. Las proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos son biopolímeros.

brazo aminoácido. Ver tallo aceptor.

brazo D. Estructura tallo y lazo en la molécula de ARNt que contiene residuos de dihidrouridilato (D).

brazo del anticodón. La estructura de tallo y lazo en una molécula de ARNt que contiene al anticodón.

brazo TψC. La estructura de tallo y lazo en una molécula de ARNt que contiene una secuencia de ribotimidilato-pseudouridilato-citidilato (TψC).

brazo variable. El brazo de una molécula de ARNt que se ubica entre el brazo anticodón y el brazo TψC. El brazo variable puede variar en longitud aproximadamente de tres a 21 nucleótidos.

burbuja de transcripción. Pequeña región del ADN de doble hélice que es desenrollada por el ARN polimerasa durante la transcripción.

cadena de transporte electrónico. Ver cadena respiratoria de transporte electrónico.

cadena respiratoria de transporte electrónico. Una serie de complejos enzimáticos y cofactores asociados que transportan electrones de las coenzimas reducidas o sustratos al oxígeno molecular (O_2), el aceptor terminal de electrones del metabolismo aeróbico.

caja TATA. Secuencia de ADN rica en A/T, que se encuentra dentro del promotor de genes eucarióticos y procarióticos.

calor de vaporización. Cantidad de calor requerida para evaporar 1 g de un líquido.

calor específico. Cantidad de calor requerida para elevar la temperatura de 1 g de sustancia en 1 °C.

caloría (cal). Cantidad de energía requerida para elevar la temperatura de 1 gramo de agua en 1 °C

(de 14.5 °C a 15.5 °C). Una caloría es igual a 4.184 J.

CAM. Ver metabolismo ácido de las crasuláceas.

cambio de energía libre (Δ*G*). Cantidad termodinámica que define la condición de equilibrio en términos de cambios en la entalpía (*H*) y la entropía (*S*) de un sistema a una presión constante. $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, donde *T* es temperatura absoluta. La energía libre es una medida de la energía disponible dentro de un sistema para que éste funcione.

cambio de la energía libre estándar (Δ*G*°′). El cambio de la energía libre estándar para una reacción bajo condiciones bioquímicas de estado estándar.

caminata de cromosomas. Técnica para ordenar fragmentos de ADN en una librería genómica. La caminata de cromosomas implica la hibridación, el mapeo de restricción y el aislamiento de moléculas de ADN recombinante imbricado.

canal. Proteína integral de membrana con un pasaje acuoso central, el cual permite que moléculas y iones de tamaño apropiado atraviesen la membrana en cualquier dirección. También conocido como poro.

canal iónico con acoplamiento de ligando. Canal iónico de membrana que se abre o cierra en respuesta a una unión a un ligando específico.

canal iónico de compuerta. Proteína de membrana transportadora que permite a los iones atravesar la bicapa como respuesta a los cambios en la tensión o presión osmótica en un lado de la membrana.

canal iónico de compuertas de voltaje. Proteína de membrana transportadora que permite que los iones atraviesen la bicapa como respuesta a cambios en las propiedades eléctricas de la membrana.

canalización. Ver canalización metabólica.

canalización de metabolitos. Transferencia del producto de una reacción de una enzima multifuncional o un complejo multienzimático directamente al siguiente sitio activo o enzima sin ingresar el disolvente a granel. La canalización incrementa la velocidad de una ruta de reacción al disminuir el tiempo de tránsito en que intermediario alcanza la siguiente enzima o al producir altas concentraciones locales del intermediario.

cap. Residuo de 7-metilguanosina unido por un enlace pirofosfato al extremo 5′ de una molécula eucariota de ARNm. El casquete se agrega de manera postranscripcional y se requiere para una traducción eficiente. Las modificaciones covalentes adicionales producen estructuras alternativas de casquete.

capacidad catalítica. Relación entre las constantes de velocidad para una reacción en presencia de una enzima (k_{cat}/K_m) con respecto a la constante de velocidad para la reacción química en ausencia de la enzima.

capacidad de amortiguación. Capacidad de una disolución de resistir los cambios en el pH. Para un amortiguador determinado, el pH alcanza su capacidad máxima cuando las concentraciones del ácido débil y su base conjugada son iguales (es decir, cuando el pH = pK_a).

carbanión. Anión carbono resultante del clivaje de un enlace covalente entre carbono y otro átomo en el cual ambos electrones provenientes de la unión permanecen con el átomo de carbono.

carbocatión. Catión de carbono resultante del clivaje de un enlace covalente entre el carbono y otro átomo en el cual el átomo de carbono pierde ambos electrones del enlace.

carbohidrato. En líneas generales, se define como un compuesto que es un hidrato de carbono en el cual la relación de C:H:O es de 1:2:1. Los carbohidratos comprenden los azúcares monoméricos (es decir, monosacáridos) y sus polímeros. También conocidos como sacáridos.

carbono anomérico. El átomo de carbono más oxidado de un monosacárido cíclico. El carbono anomérico tiene la reactividad química de un grupo carbonilo.

carboxilo-terminal. Ver *C*-terminal.

carcinógeno. Agente que puede provocar cáncer.

carga de carbohidratos. La práctica de un atleta de agotar el glucógeno del músculo mediante el ejercicio intenso seguido por el consumo de alimentos altos en carbohidratos, lo que da como resultado cantidades de glucógeno muscular más altas de lo normal.

cariotipo. Conjunto de cromosomas visualizados por tinción.

cascada. Activación secuencial de varios componentes, que da como resultado una amplificación de señal.

catálisis ácido-base. Catálisis en la cual la transferencia de un protón acelera una reacción.

catálisis covalente. Catálisis en la cual un sustrato, o parte de él, forma un enlace covalente con el catalizador y después se transfiere a un segundo sustrato. Muchas reacciones enzimáticas de transferencia de grupo se llevan a cabo por medio de la catálisis covalente.

catálisis general de ácidos-base. Catálisis ácidos-base que implica la transferencia protónica de un ácido diferente a H^+ o una base diferente a OH^-.

catión. Ion con una carga positiva neta.

cátodo. Electrodo cargado negativamente. En la electroforesis, los cationes se mueven hacia el cátodo.

CBP. Ver proteína de unión del casquete.

celulosa. Homopolímero lineal (sin ramas) de residuos de glucosa unidos por enlaces β-(1 → 4) glucosídicos. Como polisacárido estructural de las paredes celulares de las plantas, la celulosa representa más de 50% de la materia orgánica en la biosfera.

centro catalítico. Aminoácidos polares en el sitio activo de un enzima que participan en cambios químicos durante la catálisis.

centro de reacción. Complejo de proteínas, cofactores de transportación de electrones, y un par especial de moléculas de clorofila que forma el centro de un sistema. El centro de reacción es el sitio de conversión de energía fotoquími ca en energía electroquímica durante la fotosíntesis.

centro reactivo. Parte de una coenzima a la cual están unidos los grupos metabólicos móviles.

cera. Éster no polar compuesto por un alcohol monohidroxílico de cadena larga y un ácido graso de cadena larga.

ceramida. Molécula compuesta por un ácido graso unido al grupo amino C-2 de la esfingosina por un enlace amida. Las ceramidas son los precursores metabólicos de todos los esfingolípidos.

cerebrósido. glicoesfingolípido que contiene un residuo de monosacárido unido por medio del enlace β-glucosídico al C-1 de una ceramida. Los cerebrósidos abundan en el tejido nervioso y se encuentran en las vainas de mielina.

cetimina. Ver base de Schiff.

cetogénesis. Ruta que sintetiza cuerpos cetónicos a partir del acetil-CoA en la matriz mitocondrial en los mamíferos.

cetosas. Tipo de monosacárido en el cual el átomo de carbono más oxidado, por lo general el C-2, es cetónico.

chaperona. Proteína que forma complejos con cadenas de polipéptidos y ayuda al plegamiento correcto en conformaciones biológicamente funcionales. Las chaperonas pueden también impedir la formación de intermediarios plegados de manera incorrecta, impiden la agregación imperfecta de subunidades de proteínas desensambladas, ayudan a la translocación de cadenas de polipéptidos a través de membranas, y al ensamblado y desensamblado de estructuras multiproteínicas grandes.

ciclo de Calvin. Ciclo de reacciones que implican la fijación del dióxido de carbono y la producción neta del gliceraldehído-3-fosfato. Por lo general, está asociado con la fotosíntesis. También se conoce como el ciclo Calvin-Benson, la ruta C_3, y el ciclo reductivo de la pentosa fosfato (RPP).

ciclo de Calvin-Benson. Ver ciclo de Calvin.

ciclo de Cori. Circuito metabólico en el que participan varios órganos, que recicla el carbono y transporta energía del hígado a los tejidos periféricos. La glucosa se libera del hígado y se metaboliza para producir ATP en otros tejidos. Luego, el lactato resultante es devuelto al hígado para su conversión a glucosa mediante la gluconeogénesis.

ciclo de Krebs. Ver ciclo del ácido cítrico.

ciclo de la glucosa-alanina. Circuito metabólico interorgánico que transporta nitrógeno al hígado y la energía del hígado a los tejidos periféricos. La glucosa se libera del hígado y se metaboliza en el músculo para convertirse en piruvato, con la producción concomitante de ATP. El piruvato se puede convertir en alanina en el músculo. La alanina es regresada al hígado, donde se metaboliza en amoniaco y piruvato. El amoniaco se incorpora a la urea, y el piruvato se convierte una vez más en glucosa mediante la gluconeogénesis.

ciclo de la urea. Ciclo metabólico compuesto por cuatro reacciones catalizadas por enzimas que convierten el nitrógeno del amoniaco y aspartato en urea. Los cuatro equivalentes de ATP se consumen durante la formación de una molécula de urea.

ciclo de reducción del carbono fotosintético. Ver ciclo reductivo de las pentosas fosfato.

ciclo del ácido cítrico. Ciclo metabólico compuesto por ocho reacciones de enzima catalizada que oxidan por completo las unidades de acetilo en el CO_2. La energía liberada en las reacciones oxidación se conserva como energía de reducción cuando las coenzimas NAD+ y la ubiquinona (Q) se reducen. La oxidación de una molécula de acetil–CoA mediante el ciclo del ácido cítrico genera tres moléculas de NADH, una molécula de QH_2 y una molécula de GTP o ATP. También se conoce como ciclo de Krebs y ciclo del ácido tricarboxílico.

ciclo del ácido graso-glucosa. Sistema regulador interorgánico que opera para abastecer de ácidos grasos como combustible alternativo a la glucosa. Cuando los niveles de glucosa son bajos, los niveles de insulina también lo son, por lo que se liberan ácidos grasos libres a partir de los adipocitos. El metabolismo de los ácidos grasos genera inhibidores del metabolismo de la glucosa, y por lo tanto economiza su uso.

ciclo del ácido tricarboxílico. Ver ciclo del ácido cítrico.

ciclo del nitrógeno. Flujo del nitrógeno de N_2 a óxidos de nitrógeno (NO_2^- y NO_3^-), amoniaco, biomoléculas nitrogenosas y de nuevo a N_2.

ciclo del nucleótido de purina. Ruta en el músculo que convierte el aspartato en fumarato y amoniaco.

ciclo del sustrato. Un par de reacciones opuestas y metabólicamente irreversibles, que cataliza un ciclo entre dos intermediarios de ruta. Los ciclos del sustrato proporcionan sitios reguladores sensibles.

ciclo del glioxilato. Variación del ciclo del ácido cítrico en ciertas plantas, bacterias y levaduras que permite la producción neta de glucosa a partir del acetil-CoA vía oxaloacetato. El ciclo del glioxilato elude los pasos productores de CO_2 del ciclo del ácido cítrico.

ciclo *Q*. Ruta cíclica propuesta para explicar la secuencia de transferencias electrónicas y movimientos protónicos dentro del complejo III en la mitocondria o del complejo *bf* citocromo en los cloroplastos. El resultado neto de los dos pasos del ciclo *Q* es la oxidación de dos moléculas de QH_2 o plastoquinol (PQH_2); formación de una molécula de QH_2 o PQH_2, transferencia de dos electrones; desplazamiento neto de cuatro protones a través de la membrana mitocondrial interna hacia el espacio entre membranas o a través de la membrana tilacoide hacia el lumen.

ciclo reductivo de la pentosa fosfato (ciclo RPP). Ver ciclo de Calvin.

ciclo RPP. Ver ciclo de las pentosas fosfato.

cierre de leucina. Diseño estructural encontrado en las proteínas de unión al ADN y en otras proteínas. La cremallera se forma cuando las caras hidrofóbicas (que frecuentemente contienen residuos de leucina) de dos hélices α anfipáticas de la misma o diferente cadena de polipéptidos interactúan para formar una estructura de espiral enrollada.

cinasa. Enzima que cataliza la transferencia de un grupo fosforilo a una molécula aceptora. La proteína cinasa cataliza la fosforilación de los sustratos proteínicos. Las cinasas también se conocen como fosfotransferasas.

cinética. Estudio de las velocidades de cambio, como las velocidades de las reacciones químicas.

cisterna. El lumen de una vesícula del aparato de Golgi.

citocromo. Proteína que contiene un gupo hemo, que es un transportador electrónico en procesos como la respiración y fotosíntesis.

citoesqueleto. Red de proteínas que contribuye a la estructura y organización de una célula eucariota.

citoplasma. Parte de una célula contenida por la membrana plasmática, sin incluir al núcleo.

citosol. Porción acuosa del citoplasma, menos las estructuras subcelulares.

clon. Una de las copias idénticas derivadas de la replicación o reproducción de una sola molécula, célula u organismo.

clonación. Generación de muchas copias idénticas de una molécula, célula u organismo. La clonación algunas veces se refiere al proceso completo de construcción y propagación de una molécula de ADN recombinante.

clorofila. Pigmento verde en las membranas fotosintéticas que es el principal componente recolector de luz en los organismos fototrópicos.

cloroplasto. Organelo con contenido de clorofila que se encuentra en las células de algas y plantas, y que es el sitio de la fotosíntesis.

código genético. Correspondencia entre un codón particular de tres nucleótidos y el aminoácido que éste especifica. El código genético estándar de 64 codones se utiliza casi por todos los organismos. El código genético se utiliza para traducir la secuencia de nucleótidos de ARNm en la proteína.

codón. Secuencia de tres residuos de nucleótidos en ARNm (o ADN) que especifica un aminoácido particular de acuerdo con el código genético.

codón de iniciación. Codón que especifica el sitio de iniciación para la síntesis de proteínas. El codón de metionina (AUG) es el codón de iniciación más común.

codón de parada. Ver codón de terminación.

codón de terminación. Codón al que reconocen proteínas específicas que ocasionan que los péptidos recientemente sintetizados sean liberados de la maquinaria de traducción y por lo tanto finalizan la traducción. Los tres codones determinación (UAG, UAA y UGA) también se denominan codones de parada.

codones sinónimos. Codones diferentes que especifican al mismo aminoácido.

coeficiente de permeabilidad. Medida de la capacidad de un ion o molécula pequeña para difundirse a través de la bicapa lipídica.

coenzima derivada de vitaminas. Coenzimas sintetizadas a partir de una vitamina.

coenzima metabolito. Coenzima sintetizada a partir de un metabolito común.

coenzima proteína. Proteína que no cataliza por sí misma las reacciones pero que se requiere para la acción de ciertas enzimas. También se denomina proteína de transferencia de grupo.

coenzimas. Molécula orgánica requerida por una enzima para la actividad completa. Las coenzimas pueden subdividirse en cosustratos o grupos prostéticos.

cofactor. Ion inorgánico o molécula orgánica requerida por una apoenzima para convertirla en una holoenzima. Existen dos tipos de cofactores: iones esenciales o coenzimas.

cola poli A. Segmento de poliadenilato, de hasta 250 residuos de nucleótidos de longitud, que se agrega al extremo 3′ de una molécula eucariota ARNm después de la transcripción.

combustible metabólico. Pequeño compuesto que se puede catabolizar para liberar energía. En los organismos celulares, los combustibles metabólicos se pueden transportar entre los tejidos.

compensación de dosis. Desactivación selectiva de ciertos genes presentes en múltiples copias dentro de una célula para controlar el nivel de expresión genética.

complejo de iniciación de la traducción. El complejo de subunidades ribosomales, un molde de ARNm, una molécula de ARNt iniciador y factores de iniciación que se ensamblan al inicio de la síntesis proteica.

complejo de iniciación de la transcripción. El complejo de ARN polimerasa y otros factores que ensamblan en el promotor al inicio de la trascripción.

complejo de traducción. El complejo de un ribosoma y factores proteínicos que desempeña la traducción del ARNm *in vivo*.

complejo enzima-sustrato (ES). Complejo formado cuando las moléculas de sustrato se unen de manera no covalente con el sitio activo de una enzima.

complejo multienzimático. Proteína oligomérica que cataliza varias reacciones metabólicas.

complejo captador de luz (LHC). Complejo de pigmento grande en la membrana tilacoide que ayuda a un fotosistema en la captación de luz.

complementación. Técnica general para detectar un gen o proteína determinado mediante la prueba de su capacidad para proveer el producto del gen faltante en la célula anfitriona.

compuesto cetogénico. Compuesto como un aminoácido, que puede ser degradado para formar acetil-CoA y por lo tanto contribuir a la síntesis de ácidos grasos o cuerpos cetónicos.

compuesto glucogénico. Compuesto, como un aminoácido, que puede utilizarse en la gluconeogénesis de animales.

compuesto rico en energía. Compuesto cuya hidrólisis ocurre con un gran cambio de energía libre negativa (igual o mayor que la del ATP $\rightarrow$ ADP + P_i).

condensación. Reacción que implica la unión de dos o más moléculas acompañadas por la eliminación de agua, alcohol u otra sustancia simple.

configuración. Distribución atómica espacial, la cual no se puede alterar sin romper o reformar los enlaces covalentes.

conformación. Cualquier estructura tridimensional, o distribución espacial, de una molécula resultante de la rotación de grupos funcionales en torno a enlaces simples. Debido a que hay una rotación libre alrededor de enlaces simples, una molécula tiene la posibilidad de asumir múltiples conformaciones.

conjugación. El paso de material genético de una bacteria otra a través de pili sexuales.

constante catalítica (K_{cat}). Constante cinética que es una medición de la rapidez con la que una enzima puede catalizar una reacción cuando está saturada con su sustrato(s). La constante catalítica es igual a la velocidad máxima ($V_{máx}$) dividida entre la concentración total enzimática ($[E]_{total}$), o el número de moles de sustrato convertido a producto por mol de sitios activos de enzima por segundo, bajo condiciones de saturación. También conocida como número de recambio.

constante de disociación del ácido (K_a). La constante de equilibrio para la disociación de un protón a partir de un ácido.

constante de equilibrio (K_{eq}). La proporción de concentración de productos en las concentraciones de reactivos en equilibrio. La constante de equilibrio está relacionada con el cambio de energía libre estándar de una reacción.

constante de inhibición (K_i). La constante de equilibrio para la disociación de un inhibidor proveniente de un complejo inhibidor enzimático.

constante de Michaelis (K_m). Concentración de sustrato que produce una velocidad inicial (v_0) igual a la mitad de la velocidad máxima ($V_{máx}$) para una reacción determinada.

constante de transporte (K_{tr}). La concentración de sustrato a la cual la velocidad de transporte a través de la membrana vía una proteína transportadora es la mitad del máximo. K_{tr} es análogo a la constante de Michaelis (K_m) de una enzima.

constante especificidad. Ver k_{cat}/K_m.

cooperatividad. **1.** Fenómeno donde la unión de un ligando o molécula de sustrato a una proteína influye la afinidad de la proteína por moléculas adicionales de la misma sustancia. La cooperatividad puede ser negativa o positiva. **2**. Fenómeno donde la formación de la estructura en una parte de la macromolécula promueve la formación de la estructura en el resto de la molécula.

correpresor. Ligando que une a un represor de un gen, lo que ocasiona que se una al ADN e impida la transcripción.

corte y empalme. Proceso de supresión de intrones y unión de exones para formar una molécula continua de ARN.

cósmido. Un vector de clonación que acomoda grandes fragmentos insertos de ADN. Los cósmidos permiten la transfección eficiente pero también la propagación de moléculas de ADN recombinante como plásmidos.

cosustratos. Coenzimas que fungen como sustratos en una reacción catalizada por enzimas. Un cosustrato se altera durante el curso de la reacción y se disocia del sitio activo de la enzima. La forma original del cosustrato puede regenerarse en una posterior reacción catalizada por enzima.

cotransporte. Transporte acoplado de dos diferentes especies de solutos a través de una membrana, en la misma dirección (sinpuerto) o la dirección opuesta (antipuerto), llevada a cabo por una proteína transportadora.

crestas. Plegamientos de la membrana interna mitocondrial.

cribado. Prueba de las células transformadas en busca de la presencia de la molécula deseada de ADN recombinante.

cristalografía de rayos X. Técnica utilizada para determinar la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de las macromoléculas biológicas. En la cristalografía de rayos X, se bombardea con rayos X un cristal de una macromolécula, estos rayos se difractan y entonces se detectan electrónicamente mediante una película. La estructura atómica se deduce con la ayuda de análisis matemáticos del patrón de difracción.

cromatina. Un complejo de ADN-proteína en los núcleos de células eucarióticas.

cromatografía. Técnica utilizada para separar componentes de una mezcla con base en la división entre la fase móvil, que puede ser un gas o líquido, y la fase estacionaria, que es un líquido o sólido.

cromatografía de afinidad. Técnica cromatográfica que se utiliza para separar una mezcla de proteínas u otras macromoléculas en una disolución basada en una unión específica con un ligando que está unido covalentemente a la matriz cromatográfica.

cromatografía de capa delgada. Técnica cromatográfica utilizada para separar componentes de una mezcla sobre una capa delgada de material poroso.

cromatografía de filtración en gel. Técnica cromatográfica utilizada para separar una mezcla de proteínas u otras macromoléculas en una disolución con base en su tamaño molecular, mediante una matriz de gránulos porosos. También se le conoce como cromatografía de exclusión molecular.

cromatografía de gases. Técnica cromatográfica utilizada para separar componentes de una mezcla con base en sus divisiones entre la fase gaseosa y la estacionaria, la cual puede ser líquida o sólida.

cromatografía de intercambio iónico. Técnica cromatográfica utilizada para separar una mezcla de especies iónicas en una disolución, mediante una matriz cargada. En la cromatografía de intercambio aniónico, la matriz cargada positivamente une negativamente a los solutos cargados, y en la cromatografía de intercambio catiónico, una matriz cargada negativamente une solutos positivamente cargados. La especie de unión puede eluirse serialmente de la matriz mediante el cambio gradual del pH o el incremento en la concentración salina del disolvente.

cromatografía líquida a alta presión (HPLC). Técnica cromatográfica utilizada para separar los componentes de una mezcla mediante la disolución de la mezcla en un disolvente líquido y su flujo forzado a través de una columna cromatográfica bajo condiciones de alta presión.

cromosoma. Una sola molécula de ADN que contiene muchos genes. Un organismo puede tener un genoma compuesto por un solo cromosoma o por varios.

cromosoma artificial de la levadura (YAC). Un vector de clonación que contiene ADN centromérico de levadura y un origen de replicación de levadura. Un YAC puede acomodar hasta 500 pares de kilobases de ADN inserto. El cromosoma artificial puede introducirse en una célula de levadura, donde se comporta como un cromosoma normal durante la replicación.

cromosoma de politeno. Cromosoma que se replica muchas veces sin separación de las copias. La estructura resultante está compuesta por regiones de cromatina condensada y regiones expandidas para formar engrosamientos cromosómicos.

***C*-terminal**. Residuo de aminoácido que porta un grupo carboxilo libre en un extremo de la cadena péptida. También conocido como carboxilo-terminal.

cubierta nuclear. Membrana doble que rodea al núcleo y que contiene un complejo de poros nucleares recubiertos de proteína que regulan la importación y exportación de material a y del núcleo. La membrana exterior de la cubierta nuclear es continua con el retículo endoplásmico; la membrana interna está recubierta con proteínas filamentosas, lo que constituye la lámina nuclear.

cuerpos cetónicos. Pequeñas moléculas sintetizadas en el hígado a partir de la acetil-CoA. Durante la inanición, los cuerpos cetónicos β- hidroxibutirato y el acetoacetato se convierten en los principales combustibles metabólicos.

dactiloscopía del ADN. Análisis del polimorfismo genético de diferentes individuos.

dalton. Unidad de masa igual a una unidad de masa atómica.

deaminasa. Molécula que cataliza la remoción de un grupo amino a partir un sustrato, mientras libera amoniaco.

dedo de zinc. Diseño estructural que se encuentra con frecuencia en las proteínas de ADN de unión. El dedo se forma cuando una porción de aproximadamente 30 aminoácidos forman un lazo cuya base está anclada por el ZN^{2+}. El ZN^{2+} se coordina mediante dos residuos de histidina conservados y dos residuos de cisteína conservados en la base del lazo.

degeneración. Cuando se refiere al código genético, la degeneración supone el hecho de que varios codones diferentes especifiquen al mismo aminoácido.

degradación de Edman. Procedimiento utilizado para determinar la secuencia de residuos de aminoácidos a partir de un *N*-terminal libre en una cadena de polipéptidos. El residuo *N*-terminal se modifica químicamente, se corta de la cadena y se identifica mediante procedimientos cromatográficos, y se recupera el resto de polipéptidos. Los múltiples ciclos de reacción permiten la identificación del nuevo residuo *N*-terminal generado por cada paso de clivaje.

desactivación por inserción. Desactivación de un gen ocasionada por insertar un fragmento de ADN a la región codificante de un gen.

desfase del marco de traducción. Un cambio en el marco de lectura que puede ocurrir durante la traducción de una molécula de ARNm. La síntesis de algunas proteínas requiere el desfase del marco de traducción.

deshidrogenasa. Enzima que cataliza la remoción de hidrógeno de un sustrato o la oxidación de un sustrato. Las deshidrogenasas son miembros de la clase IUBMB de enzimas conocidas como oxidorreductasas.

desnaturalización. **1**. Disrupción en la conformación nativa de una macromolécula biológica que provoca una pérdida de actividad biológica en la macromolécula. **2**. El completo desenvolvimiento y separación de las hebras complementarias de ADN.

desoxirribonucleasa (ADNsa). Enzima que cataliza la hidrólisis de ácidos desoxirribonucleicos para formar oligodesoxinucleótidos y/o monodesoxinucleótidos.

desplazamiento. **1**. El movimiento del ribosoma mediante un codón a lo largo de una molécula de ARNm. **2.** El movimiento de un polipéptido a través de una membrana.

desviación hexosa monofosfato. Ver ruta de la pentosa fosfato.

detergente. Molécula anfipática compuesta por una porción hidrofóbica y un extremo hidrofílico, que puede ser iónica o polar. Las moléculas detergentes pueden agregarse a un medio acuoso para formar micelas. También conocido como un surfactante.

dextrina límite. Oligosacárido ramificado derivado de un polisacárido de glucosa mediante la acción hidrolítica de la amilasa o de la acción fósforolítica del glucógeno fosforilasa o del almidón fosforilasa. Las dextrinas límite son resistentes a una mayor degradación catalizada por la amilasa o fosforilasa. Las dextrinas límite pueden degradarse más sólo después de la hidrólisis de los enlaces α-(1 $\rightarrow$ 6).

diabetes mellitus. Enfermedad metabólica caracterizada por la hiperglucemia resultante de la regulación anormal del metabolismo combustible mediante la insulina. La diabetes mellitus puede ser ocasionada por la falta de insulina o por la capacidad deficiente de respuesta de las células a la insulina.

diagrama del recíproco doble. Diagrama del recíproco de la velocidad inicial en relación con el recíproco de la concentración de sustrato para una reacción catalizada por enzimas. Las intercepciones de x y y indican los valores de los recíprocos de la constante de Michaelis y la velocidad máxima, respectivamente. Un diagrama del recíproco doble es una transformación lineal de la ecuación del Michaelis-Menten. También conocida como diagrama de Lineweaver-Burk.

diagrama Lineweaver-Burk. Ver diagrama doble recíproco.

diagramas de Ramachandran. Diagrama de los valores de ψ en comparación con los de ϕ para los residuos de aminoácidos en una cadena polipeptídica. Ciertos valores de ϕ y ψ son característicos de conformaciones diferentes.

diálisis. Procedimiento en el cual se eliminan los solutos de peso molecular bajo en una muestra mediante la difusión a través de una barrera semipermeable y se reemplazan por los solutos del medio circundante.

difusión facilitada. Ver transporte pasivo.

difusión lateral. Movimiento rápido de un lípido o moléculas de proteínas dentro de un plano de una hojilla de una bicapa lipídica.

difusión transversa. El paso de una molécula de lípido o proteína de una hojilla de bicapa lipídica a otra hojilla. A diferencia de la difusión lateral dentro de una hojilla o bicapa, la difusión transversa es extremadamente lenta.

digestión. Proceso mediante el cual las macromoléculas dietéticas se hidrolizan para convertirse en moléculas más pequeñas que un organismo es capaz de absorber.

diploide. Que contiene dos conjuntos de cromosomas o dos copias del genoma.

dipolo. Dos cargas iguales pero opuestas, separadas en espacio, que son resultado de la distribución desigual de la carga dentro de una molécula o un enlace químico.

disolución acídica. Disolución que tiene un valor de pH menor que 7.0.

disolución neutral. Disolución acuosa que tiene un valor de pH de siete.

DNasa. Ver desoxirribonucleasa.

doble hélice. Conformación de ácido nucleico en el cual dos hebras polinucleótidas antiparalelas se envuelven entre sí para formar una estructura helicoidal de doble hebra estabilizada en su mayor parte por las interacciones de apilamiento entre pares de bases adyacentes con puentes de hidrógeno.

dodecilsulfato de sodio-electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Electroforesis en gel de poliacrilamida desempeñada en presencia del detergente dodecilsulfato de sodio. Permite la separación de proteínas con base sólo en el tamaño y no en la carga y el tamaño.

dogma central. Concepto que se refiere a que el flujo de información del ácido nucleico a la proteína es irreversible. Este término se aplica con frecuencia de manera incorrecta a la ruta real del flujo de información del ADN al ARN a la proteína.

dominio. Unidad del plegamiento independiente y discreto dentro de la estructura terciaria de una proteína. Por lo general, los dominios son combinaciones de varios diseños estructurales que forman un pliegue característico.

E. Ver potencial de reducción.

$E^{\circ\prime}$. Ver potencial de reducción estándar.

ecuación de Henderson-Hasselbalch. Ecuación que describe el pH de una disolución de un ácido débil o base débil en términos de pK_a y las concentraciones del donante de protones y el aceptor de protones.

ecuación de Michaelis-Menten. Ecuación de velocidad que relaciona la velocidad inicial (v_0) de una reacción enzimática con la concentración de sustrato ([S]), la velocidad máxima ($V_{máx}$) y la constante de Michaelis (K_m).

ecuación de Nernst. Ecuación que relaciona el cambio observado en el potencial de reducción (ΔE) con respecto al cambio en el potencial de reducción estándar ($\Delta E^{\circ\prime}$) de una reacción.

ecuación de velocidad. Expresión de la relación observada entre la velocidad de una reacción y la concentración de cada reactivo.

efecto de Bohr. Fenómeno observado cuando la exposición al dióxido de carbono, la cual hace descender el pH interior de las células, ocasiona que la afinidad de oxígeno de la hemoglobina en los glóbulos rojos disminuya.

efecto de Pasteur. La desaceleración de la glucólisis en presencia de oxígeno.

efecto de proximidad. El incremento en la velocidad de una reacción no enzimática o enzimática atribuible a altas concentraciones efectivas de reactivos, lo que da como resultado una formación más frecuente de estados de transición.

efecto hidrofóbico. La exclusión de grupos o moléculas hidrofóbicas por el agua. Aparentemente el efecto hidrofóbico depende del incremento en la entropía de las moléculas de agua disolventes que se liberan de una distribución ordenada en torno al grupo hidrofóbico.

efecto quelato. Fenómeno mediante el cual la constante de unión de un ligando que tiene dos o más sitios de unión a una molécula o átomo, es mayor que la constante de unión para ligandos separados de la misma molécula o átomo.

efector alostérico. Ver modulador alostérico.

eicosanoide. Derivado oxigenado de un ácido graso poliinsaturado de 20 átomos de carbono. Los eicosanoides tienen la función de mensajeros de corto alcance en la regulación de varios procesos fisiológicos.

electrófilo. Especie cargada positivamente o con carencia de electrones, que es atraída hacia una especie química negativamente cargada o con pares electrónicos sin compartir (nucleófilos).

electroforesis. Técnica utilizada para separar moléculas mediante su migración en un campo eléctrico, principalmente con base en su carga neta.

electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). Técnica utilizada para separar moléculas de diferente carga neta y/o tamaño con base en su migración a través de una matriz en gel altamente unida en forma de cruz en un campo eléctrico.

elemento de respuesta hormonal. Secuencia de ADN que une el activador transcripcional que consiste en un complejo hormona esteroide-receptor.

elemento invertible. Ver transposón.

elemento traza. Elemento que los organismos vivos requieren en muy pequeñas cantidades. Algunos ejemplos incluyen el cobre, hierro y zinc.

elevación. Distancia entre un residuo y el siguiente a lo largo del eje de una macromolécula helicoidal.

emf. Ver fuerza electromotriz.

enantiómeros. Estereoisómeros que son imágenes especulares que no se pueden superponer.

endocitosis. Proceso mediante el cual la membrana plasmática engulle a la materia y la conduce al interior de la célula dentro de una vesícula lipídica derivada de la membrana.

endonucleasa. Enzima que cataliza la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster en diferentes sitios dentro de cadenas de polinucleótidos.

endonucleasa de restricción. Una endonucleasa que cataliza la hidrólisis del ADN de doble hebra a una secuencia específica de nucleótidos. Las endonucleasas de restricción del tipo I catalizan tanto la metilación del ADN anfitrión como el clivaje del ADN no metilado, mientras las endonucleasas de restricción del tipo II catalizan sólo el clivaje del ADN no metilado.

endosomas. Vesículas lisas al interior de la célula que son receptáculos para el material endocitado.

endotoxina. Ver lipopolisacárido.

energía de activación. La energía libre requerida para promover los reactivos de un estado basal al estado de transición en una reacción química.

enfermedad autoinmune. Padecimiento humano en el cual el cuerpo produce anticuerpos que atacan los tejidos y componentes celulares normales.

enfoque isoeléctrico. Forma modificada de electroforesis que utiliza amortiguadores para crear un gradiente de pH dentro de un gel de poliacrilamida. Cada proteína migra a su punto isoeléctrico (pI), es decir, el pH en el gradiente en el cual éste ya no transporta una carga netamente positiva o negativa.

enlace de hidrógeno de barrera baja. Enlace de hidrógeno fuerte en la cual, dos átomos electronegativos que se encuentran a una distancia de menos de 0.25nm, comparten el hidrógeno de manera equitativa.

enlace disulfuro. Enlace covalente formado por la oxidación de los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína. Los enlaces disulfuro son importantes en la estabilización de las estructuras tridimensionales de algunas proteínas.

enlace fosfoéster. Enlace mediante el cual un grupo fosforilo está unido a un oxígeno alcohólico o fenólico.

enlace glucosídico. Unión acetal formada por la condensación de un átomo de carbono anomérico de un sacárido con un grupo hidroxilo, amino o tiol de otra molécula. Los enlaces glucosídicos que se encuentran con más frecuencia están formados entre el carbono anomérico de un azúcar y el grupo hidroxilo de otro azúcar. Los enlaces nucleosídicos son enlaces N-glucosídicos.

enlace hidrógeno. Interacción electroestática débil formada cuando un átomo de hidrógeno se une covalentemente a un átomo fuertemente electronegativo y también se une al par de electrones no compartido de otro átomo electronegativo.

enlace isopeptídico. Enlace peptídico entre el grupo α-carboxilato de un aminoácido y el grupo ε-amino de un residuo de lisina.

enlace peptídico. Enlace amida covalente secundario que une el grupo carbonilo de un residuo de aminoácido del nitrógeno del grupo amina de otro en péptidos y proteínas.

ensayo enzimático. Método utilizado para analizar la actividad de una muestra enzimática. Por lo general, la actividad enzimática se mide bajo condiciones seleccionadas como que la velocidad de conversión del sustrato en producto sea proporcional a la concentración enzimática.

entalpía (*H*). Función del estado termodinámico que describe el contenido calorífico de un sistema.

entropía (*S*). Función del estado termodinámico que describe el carácter aleatorio o desorden de un sistema.

enzima. Catalizador biológico que casi siempre es una proteína. Algunas enzimas pueden requerir cofactores adicionales para funcionar. Casi todas las reacciones bioquímicas son catalizadas mediante enzimas específicas.

enzima activada por metal. Enzima que tiene un requerimiento absoluto de iones metálicos específicos o está estimulada por la adición de iones metálicos específicos.

enzima convertidora. Enzima que cataliza la modificación covalente de otra enzima, y por lo tanto cambia su actividad catalítica.

enzima distributiva. Enzima que se disocia de su producto polimérico creciente después de la adición de cada unidad monomérica y se debe reasociar con el polímero para que la polimerización prosiga (cf., enzima progresiva).

enzima interconvertible. Enzima cuya actividad está regulada por la modificación covalente. Las enzimas convertibles experimentan transiciones entre estados activos e inactivos, pero pueden congelarse en un estado u otro por sustitución covalente.

enzima procesiva. Enzima que permanece unida a su producto polimérico creciente a través de muchos pasos de polinización. (Cf. enzima distributiva).

enzima receptora. Proteína asociada a la membrana que produce un segundo mensajero intracelular como respuesta a la señal de un transductor.

enzima regulada. Enzima ubicada en un punto crítico dentro de una o más rutas metabólicas, cuya actividad puede incrementar o disminuir con base en la demanda metabólica. Las enzimas más reguladas son las oligoméricas.

epímeros. Isómeros que difieren en configuración sólo en uno de varios centros quirales.

equilibrio. Estado de un sistema en el cual la velocidad de conversión de un sustrato en producto es igual a la velocidad de conversión de un producto en sustrato. El cambio de energía libre para una reacción o sistema en el equilibrio es cero.

esfera de solvatación. Cubierta de moléculas de solvente que rodean a un ion o soluto.

esfingolípido. Lípido anfipático con un esqueleto de esfingosina (trans-4-esfingenina). Los esfingolípidos, los cuales incluyen esfingomielinas, cerebrósidos y gangliósidos, están presentes en las

membranas de plantas y animales y son particularmente abundantes en los tejidos del sistema nervioso central.

esfingomielina. Esfingolípido compuesto por fosfocolina unida al grupo hidroxilo del C-1 de una ceramida. La esfingomielina está presente en las membranas plasmáticas de la mayoría de las células de los mamíferos y son un componente principal de las vainas de mielina.

espacio periplasmático. Región entre la membrana plasmática y la pared celular en las bacterias.

especificidad de reacción. La falta de formación por parte de una enzima de subproductos de desperdicio. La especificidad de reacción da como resultado una generación de producto esencialmente del 100%.

espectrometría de masa. Técnica que determina la masa de una molécula.

espectroscopía de resonancia magnética nuclear (espectroscopía NMR). Técnica utilizada para estudiar las estructuras de moléculas en disolución. En espectroscopía de resonancia magnética nuclear, la absorción de la radiación electromagnética por moléculas en campos magnéticos de diferentes frecuencias se utiliza para determinar los estados del espín de ciertos núcleos atómicos.

espectroscopía NMR. Ver espectroscopía de resonancia magnética nuclear.

espliceosoma. Complejo grande de proteína-ARN cataliza la eliminación de intrones a partir de los precursores de ARNm. Está compuesto por pequeñas ribonucleoproteínas nucleares.

esqueleto. **1**. Las unidades repetitivas de N—C$_\alpha$—C conectadas por enlaces peptídicos en una cadena de polipéptidos. **2**. Las unidades repetitivas de azúcar-fosfato conectadas por enlaces fosfodiéster en un ácido nucleico.

estabilización del estado de transición. La unión incrementada de estados de transición a las enzimas relativas a la unión de sustratos o productos. La estabilización del estado de transición hace descender la energía de activación y por lo tanto contribuye a la catálisis.

estado de transición. Una distribución átomica inestable y de alta energía en la cual los enlaces químicos se forman o se rompen. Los estados de transición tienen estructuras entre las de los sustratos y los productos de una reacción.

estado estable. Un estado en el cual la velocidad de síntesis de un compuesto es igual a su velocidad de utilización o degradación.

estado estándar. Conjunto de condiciones de referencia para una reacción química. En bioquímica, el estado estándar se define como la temperatura de 298 K (25 °C), una presión de 1 atmósfera, una concentración de solutos de 1.0 M y un pH de 7.0.

estado R. La conformación más activa de una proteína alostérica; lo opuesto al estado T.

estado T. La conformación menos activa de una proteína alostérica; opuesto al estado R.

estereoespecificidad. La capacidad de una enzima de reconocer e influir sobre un solo estereoisómero de un sustrato.

estereoisómeros. Compuestos con la misma fórmula molecular pero con diferentes distribuciones atómicas.

esteroide. Lípido que contiene una estructura isoprenoide de cuatro anillos combinados.

esterol. Esteroide que contiene un grupo hidroxilo.

estomas. Estructuras en la superficie de la hoja a través de las cuales el dióxido de carbono se difunde directamente dentro de las células fotosintéticas.

estroma. La matriz acuosa del cloroplasto. El estroma es el sitio donde se lleva a cabo el ciclo reductivo de las pentosas fosfato, que lleva a la reducción del dióxido de carbono para convertirlo en carbohidrato.

estructura cruciforme. Conformación parecida a una cruz adoptada por el ADN de doble hebra cuando las repeticiones invertidas de una estructura de pares de bases involucran regiones complementarias dentro de la misma hebra.

estructura cuaternaria. Organización de una o más cadenas polipeptídicas dentro de una proteína multisubunidad.

estructura no repetitiva. Elemento de estructura proteica en el cual los residuos consecutivos no tienen una conformación única repetitiva.

estructura primaria. Secuencia en la cual los residuos están ligados covalentemente para formar una cadena polimérica.

estructura secundaria. Regularidades en las conformaciones locales dentro de las macromoléculas. En las proteínas, la estructura secundaria es mantenida mediante enlaces hidrógeno entre grupos carbonil y amida del esqueleto. En el ácido nucleico, la estructura secundaria es mantenida mediante enlaces hidrógeno y las interacciones de agrupación entre las bases.

estructura supersecundaria. Ver motivo.

estructura terciaria. La compactación de cadenas poliméricas en uno o más dominios dentro de la macromolécula. En las proteínas, la estructura terciaria es estabilizada gracias a las interacciones hidrofóbicas entre cadenas laterales.

eucariota. Organismo cuyas células por lo general poseen un núcleo y membranas internas. (Cf., procariota).

exocitosis. Proceso por el cual el material destinado para la secreción de una célula es encerrado en vesículas lípidas que son transportadas a y fundidas con la membrana plasmática, lo que provoca la liberación del material en el espacio extracelular.

exón. Secuencia de nucleótidos presente en el transcripto primario de ARN y en la molécula de ARN maduro. El término exón también se refiere a la región del gen que corresponde a una secuencia presente en el ARN maduro (cf., intrón).

exonucleasa. Enzima que cataliza la hidrólisis secuencial de los enlaces fosfodiéster de un extremo de una cadena de polinucleótidos.

extremo pegajoso. El extremo de una molécula de ADN de doble hélice con una extensión de una sola hebra de varios nucleótidos.

extremo reductor. El residuo que contiene un carbono anomérico libre en un polisacárido. Un polisacárido por lo general contiene no más de un extremo reductor.

extremo romo. Extremo de una molécula de doble hebra de ADN con ninguna saliente de hebra única.

factor de crecimiento. Proteína que regula la proliferación celular mediante la estimulación de las células arrestadas para que experimenten la división celular.

factor de elongación. Proteína implicada en la extensión de la cadena peptídica durante la síntesis de proteínas.

factor de iniciación. Ver factor de iniciación de la traducción.

factor de iniciación de la traducción. Proteína implicada en la formación del complejo de iniciación al principio de la síntesis proteica.

factor de liberación. Proteína implicada en la terminación de la síntesis proteica.

factor de paso. La distancia axial de un giro completo de una estructura helicoidal.

factor de transcripción. Proteína que une la región promotora, al ARN polimerasa, o a ambos durante el ensamblado del complejo de iniciación de transcripción. Algunos factores de transcripción siguen unidos durante la elongación de cadena de ARN.

factor σ. Ver subunidad σ.

fago. Ver bacteriófago.

fase absorbente. El periodo inmediatamente posterior a una comida. Durante la fase de absorción, que dura hasta cuatro horas en los humanos, la mayoría de los tejidos utilizan la glucosa como combustible.

fase postabsortiva. Periodo que sigue a la fase de absorción. Durante la fase de postabsorción, la cual dura aproximadamente 12 horas en los humanos, la glucosa se moviliza de almacenes de glucógeno y se sintetiza vía gluconeogénesis.

fermentación. Catabolismo aeróbico de los metabolitos para la producción de energía. En la fermentación alcohólica, el piruvato se convierte en etanol y dióxido de carbono.

fibra de 30 nm. Estructura de la cromatina en la cual los nucleosomas se enrollan en un selenoide de 30 nm de diámetro.

fijación del nitrógeno. Reducción del nitrógeno atmosférico en amoniaco. La fijación de nitrógeno biológico ocurre sólo en algunas especies de bacterias y algas.

filamento de actina. Filamento proteínico compuesto por moléculas de actina que se enrollan una sobre otra en una cuerda de doble hebra. Los filamentos de actina son componentes de la red citoesquelética y ejercen una función en los sistemas contráctiles de varios organismos. También se conocen como microfilamento.

filamento intermedio. Estructura compuesta por diferentes subunidades proteínicas, encontrada en el citoplasma de la mayoría de las células eucarióticas. Los filamentos intermedios son componentes de la red citoesqueletal.

fisión binaria. Proceso mediante el cual se dividen las células procariotas. Durante la fisión binaria, cada célula hija contiene una copia del material genético.

flujo. El caudal de material a través de una ruta metabólica. El flujo depende del abastecimiento de sustratos, remoción de productos y capacidades catalíticas de las enzimas implicadas en la ruta.

fluorescencia. Forma de luminiscencia en la cual la radiación visible es emitida por una molécula a medida que pasa de un estado electrónico más alto a uno más bajo.

fosfágeno. Molécula de almacenamiento de fosfato de alta energía encontrada en las células musculares animales. Los fosfágenos son fósfoamidas y tienen un potencial de transferencia de grupo fosforilo más alto que el ATP.

fosfatasa. Enzima que cataliza la remoción hidrolítica de un grupo fosforilo.

fosfatidato. Glicerofosfolípido compuesto por dos grupos de ácidos grasos esterificados a C-1 y C-2 de glicerol 3-fosfato. Los fosfatidatos son intermediarios metabólicos en la biosíntesis o descomposición de glicerofosfolípidos más complejos.

fosfoanhídrido. Compuesto formado por la condensación de dos grupos fosfato.

fosfolípidos. Lípido que contiene una mitad de fosfato.

fosfolípidos acídicos. Glicerofosfolípidos aniónicos como el fosfoinositol.

fosfolípidos neutrales. Glicerofosfolípidos, como el fosfatidil colina, que no tiene carga neta.

fosforilación. Reacción que implica la adición de un grupo fosforilo a una molécula.

fosforilación a nivel sustrato. La fosforilación de un nucleósido difosfato mediante la transferencia de un grupo fosforilo a partir de un sustrato no nucleótido.

fosforilación oxidativa. Conjunto de reacciones en las cuales los compuestos como NADH y la ubiquinona reducida (QH_2) se oxidan aeróbicamente y se genera ATP a partir del ADP y P_i. La fosforilación oxidativa consiste en dos fenómenos unidos estrechamente: la oxidación de sustratos por la cadena de transporte electrónico en la respiración, acompañada por el desplazamiento de protones a través de la membrana mitocondrial interna a fin de generar un gradiente de concentración protónica; y la formación de ATP, motivada por el flujo de protones en la matriz a través del canal en F_0F_1 ATP sintasa.

fosforilasa. Enzima que cataliza el clivaje de su sustrato(s) vía ataque núcleofílico mediante fosfato inorgánico (P_i) (es decir, por medio de la fosforólisis).

fosforólisis. Clivaje de un enlace dentro de una molécula mediante transferencia de grupo a un átomo oxígeno de un fosfato.

fosfotransferasas. Ver cinasa.

fotofosforilación. Formación de ATP dependiente de luz a partir de ADP y P_i catalizados por la ATP sintasa del cloroplasto.

fotoheterótrofo. Organismo fotosintético que requiere moléculas orgánicas como fuente de carbono.

fotón. Cantidad específica de energía luminosa.

fotorreactivación. Reparación directa del ADN dañado mediante una enzima que está activada por luz visible.

fotorrespiración. Consumo dependiente de luz de O_2 y el metabolismo subsiguiente del fosfóglicolato que ocurre principalmente en las plantas fotosintéticas del C_3. La fotorrespiración puede ocurrir debido a que el O_2 compite con el CO_2 por el sitio activo de la ribulosa, 1, 5 *bis*fosfato carboxilasa-oxigenasa, la enzima que cataliza el primer paso del ciclo reductivo de las pentosas fosfato.

fotosíntesis. Proceso mediante el cual los carbohidratos son sintetizados a partir del CO_2 atmosférico y el agua, mediante el uso de la luz como fuente de energía.

fotosistema. Unidad funcional de las reacciones de transferencia de electrones dependientes de la luz que forman parte de la fotosíntesis. Cada fotosistema embebido en la membrana contiene un centro de reacción, el cual forma el centro del fotosistema, y una acumulación de pigmentos antena absorbentes luminosos.

fotótrofo. Organismo que puede convertir la energía luminosa en energía potencial química (es decir, un organismo capaz de la fotosíntesis).

fragmento de Klenow. La porción *C*-terminal de 605 residuos del ADN polimerasa I de *E. coli* producido por proteólisis parcial. El fragmento de Klenow contiene la actividad $3' \rightarrow 5$ exonucleasa de corrección y $5' \rightarrow 3'$ polimerasa del ADN polimerasa I, pero carece de la actividad $5' \rightarrow 3'$ exonucleasa de la enzima intacta.

fragmentos de Okazaki. Hebras relativamente cortas de ADN que se producen durante la síntesis discontinua de la hebra rezagada de ADN.

fuerza de van der Waals. Fuerza intermolecular débil que se produce entre átomos neutrales mediante interacciones transitorias electroestáticas. La atracción de van der Waals es más fuerte cuando los átomos se separan por la suma de sus radios de van der Waals; la repulsión fuerte de van der Waals impide un acercamiento más estrecho.

fuerza electromotriz (emf). Medida de la diferencia entre los potenciales de reducción de las reacciones en los dos lados de una celda electroquímica (es decir, la diferencia de voltaje producida por las reacciones).

fuerza protón motriz (Δp). La energía almacenada en un gradiente de concentración protónica a través de la membrana.

furanosa. Estructura de monosacárido que forma un anillo de cinco miembros, resultado de la formación intramolecular hemiacetal.

ΔG. Ver cambio de energía libre.

$\Delta G^{\circ\prime}$. Ver cambio de energía libre estándar.

ganglióside. Glicoesfingolípido en el cual las cadenas de oligosacáridos que contienen un ácido *N*-acetilneuramínico se unen a una ceramida. Los gangliósidos están presentes en la superficie celular y proporcionan células con marcadores de superficie distintivos que pueden servir para el reconocimiento celular y para la comunicación entre células.

gen. Definido en términos generales como un segmento de ADN que se transcribe. En algunos casos, el término gen puede utilizarse también para referirse a un segmento de ADN que codifica una proteína funcional o corresponde a una molécula de ARN maduro.

genes domésticos. Genes que codifican moléculas de proteínas o ARN que son esenciales para las actividades normales de todas las células vivas.

genoma. Conjunto completo de información genética dentro de un organismo. Puede ser un cromosoma único o un conjunto de cromosomas (haploide). La mitocondria y los cloroplastos tienen genomas separados de los que se encuentran en el núcleo de las células eucarióticas.

giro (en proteínas). Ver lazo.

glicano. Término general para un oligosacárido o polisacárido. Un homoglicano es un polímero de residuos monosacáridos idénticos; un heteroglicano es un polímero de diferentes residuos de monosacáridos.

glicerofosfolípido. Lípido compuesto por dos grupos grasos de acilo unidos al C-1 y C-2 de glicerol 3-fosfato y, en la mayoría de los casos, un sustituto polar unido a la mitad del fosfato. Los glicerol fosfolípidos son componentes importantes de las membranas biológicas.

glicoconjugado. Derivado de carbohidratos en el cual una o más cadenas de carbohidratos están unidas de manera covalente a una cadena peptídica, proteína o lípido.

glicoesfingolípido. Lípido que contiene mitades de esfingosina y carbohidratos.

glicoformas. Glucoproteínas que contienen secuencias de aminoácidos idénticas pero cadenas de oligosacáridos de diferentes composiciones.

glioxisoma. Organelo que contiene enzimas especializadas para el ciclo glioxilato.

glucógeno. Homopolímero ramificado de residuos de glucosa unidos por enlaces α-$(1 \rightarrow 4)$ y ramificaciones α-$(1 \rightarrow 6)$. El glucógeno es un polisacárido de almacenamiento en animales y bacterias.

glucogenólisis. Ruta para la degradación intracelular del glucógeno.

glucólisis. Ruta catabólica compuesta por 10 reacciones catalizadas por enzimas mediante las cuales una molécula de glucosa se convierte en dos moléculas de piruvato. En el proceso, dos moléculas de ATP se forman a partir del ADP + P_i, y dos moléculas de NAD^+ se reducen a NADH.

gluconeogénesis. Una ruta para la síntesis de la glucosa a partir de un precursor no glucídico. La gluconeogénesis del piruvato implica siete reacciones cruzadas de glucólisis cercanas al equilibrio. Las tres reacciones metabólicamente irreversibles de la glucólisis son eludidas por cuatro reacciones enzimáticas que no ocurren en la glucólisis.

glucoproteína. Proteína que contiene residuos de carbohidratos unidos covalentemente.

***N*-glucoproteína de unión**. Glucoproteína en la cual una o más cadenas de oligosacáridos se unen a la proteína a través de enlaces covalentes al átomo de nitrógeno amida de la cadena lateral de los residuos de asparagina. Las cadenas de oligosacáridos de *N*-glicoproteínas de unión contienen un pentasacárido central de dos residuos de *N*-acetilglucosamina y tres residuos de manosa.

***O*-glucoproteína de unión**. Glucoproteína en la cual una o más cadenas de oligosacáridos están unidas a la proteína a través de enlaces covalentes, por lo general, al átomo de oxígeno del hidroxilo de los residuos de serina y treonina.

glucoproteína unida a fosfatidilinositol-glicano. Glucoproteína en la cual la proteína está unida a una mitad de fosfoetanolamina que está unido a un oligosacárido ramificado al cual está unido el fosfatidilinositol-glicano. La estructura fosfatidil glicano se conoce como ancla de GPI a membrana.

glucosaminoglicanos. Polisacárido no ramificado de unidades disacáridas repetitivas. Un componente del disacárido es un aminoazúcar; el otro compuesto por lo general es un ácido urónico.

glucósido. Molécula que contiene un carbohidrato en el cual el grupo hidroxilo de un carbono anomérico ha sido reemplazado a través de la condensación con un alcohol, una amina o un tiol.

glucosilación. Ver glucosilación de proteínas.

glucosilación de proteína. La adición covalente de un carbohidrato a las proteínas. En la *N*-glicosilación, el carbohidrato se une a un grupo amida de una cadena lateral de un residuo de asparagina. En la *O*-glicosilación, el carbohidrato se une a un grupo hidroxilo de la cadena lateral de un residuo de serina o treonina.

gránulos. Apilamiento de vesículas aplanadas formadas a partir de la membrana tilacoide en los cloroplastos.

grupo de partida. El grupo desplazado resultante del clivaje de un enlace covalente.

grupo peptídico. Átomos de nitrógeno y carbono implicados en un enlace peptídico y sus cuatro sustitutivos: el átomo de oxígeno carbonilo, átomo de hidrógeno amina y dos átomos adyacentes de carbono α.

grupo prostético. Coenzimas que están estrechamente unidas a una enzima. Un grupo prostético, a diferencia del sustrato, permanece unido a un sitio específico de la enzima a través del ciclo catalítico de la enzima.

grupo R. Parte de una molécula que no se muestra explícitamente en una estructura química, como el grupo alquilo o la cadena lateral de un aminoácido.

H. Ver entalpía.

haploide. Que tiene un solo conjunto de cromosomas o una copia de genoma (Cf. diploide).

HDL. Ver lipoproteínas de alta densidad.

hebra antisentido. En el ADN de doble hebra, la hebra antisentido es aquella que no contiene codones. También se denomina hebra molde. La hebra opuesta se denomina hebra sentido o hebra codificante.

hebra codificante. Hebra de ADN dentro de un gen cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la de ARN producida por transcripción (con el reemplazo de T por U en el ARN).

hebra de sentido. En el ADN de doble hebra la hebra de sentido es aquella que contiene los codones. También llamada hebra codificante. La hebra opuesta se denomina hebra sin sentido o hebra molde.

hebra líder. Hebra de ADN recientemente sintetizada formada por la $5' \rightarrow 3'$ polimerización continua en la misma dirección que el movimiento de la horquilla de replicación.

hebra molde. La hebra de ADN adentro del gen cuya secuencia de nucleótidos es complementaria a la del ARN trascrito. Durante la transcripción, el ARN polimerasa se une a y se mueve a través de la hebra molde en la dirección $3' \rightarrow 5'$ con lo que cataliza la síntesis de ARN en dirección $5' \rightarrow 3'$.

hebra rezagada. Hebra de ADN recientemente sintetizada formada por la polimerización discontinua de $5' \rightarrow 3'$ en dirección del movimiento de la horquilla de replicación opuesta.

hebra β. Cadena extendida de polipéptidos dentro de una estructura secundaria de lámina β o que tiene la misma conformación que una hebra dentro de una lámina β.

helicasa. Enzima que está implicada en el desenrrollamiento del ADN.

hélice 3_{10}. Estructura secundaria de proteínas, compuesta por una hélice en la cual el oxígeno carbonilo de cada residuo de aminoácido (residuo n) forma un enlace de hidrógeno con el hidrógeno amida del tercer residuo más cercano al *C*-terminal de la cadena polipeptídica (residuo $n + 3$).

hélice α. Estructura secundaria común en las proteínas, en la cual el oxígeno del carbonilo de cada residuo de aminoácido (residuo n) forma un enlace por puente de hidrógeno con el hidrógeno amida del cuarto residuo más hacia el *C*-terminal de la cadena polipetídica (residuo $n + 4$). En una hélice α dextrógira ideal, las posiciones equivalentes se repiten cada 0.54 nm, cada residuo de aminoácido avanza por la hélice 0.15 nm por la línea su eje largo, y son necesarios 3.6 residuos de aminoácidos por giro de hélice.

hemiacetal. Producto formado cuando un alcohol reacciona con un aldehído.

hemicetal. Producto formado cuando un alcohol reacciona con una cetona.

hemoglobina. Proteína globular y tetramérica con contenido hemo que se encuentra en los glóbulos rojos, encargada de transportar oxígeno (O_2) a otras células y tejidos.

heterocromatina. Regiones de cromatina altamente condensadas.

heteroglicano (heteropolisacárido). Polímero de carbohidrato cuyos residuos están compuestos por dos o más tipos diferentes de monosacáridos.

heterótrofo. Organismo que requiere al menos un nutriente orgánico, entre otros la glucosa, como fuente de carbono.

hidratación. Estado en el cual una molécula o ion está rodeada por agua.

hidrofilicidad. Grado al cual un compuesto o grupo funcional interactúan con el agua o es preferentemente soluble en agua.

hidrofobicidad. Grado al cual un compuesto o grupo funcional que es soluble en disolventes no polares es insoluble o sólo moderadamente soluble en agua.

hidrolasas. Enzima que cataliza la ruptura hidrolítica de su sustrato(s) (es decir, hidrólisis).

hidrólisis. Clivaje de un enlace dentro de una molécula mediante la transferencia del grupo al agua.

hidropatía. Medida de la hidrofobicidad de las cadenas laterales de aminoácidos. Cuanto más positivo sea el valor de la hidropatía, mayor será su hidrofobicidad.

histonas. Tipo de proteínas que se unen al ADN para formar cromatina. Los núcleos de las células eucarióticas contienen cinco histonas conocidas como H1, H2A, H2B H3 y H4.

hojilla. Una capa de una bicapa lipídica.

holoproteína. Proteína activa que posee todos sus cofactores y subunidades.

homeostasis. Conservación de un estado metabólico constante.

homeostasis de la glucosa. El mantenimiento de niveles constantes de glucosa en la circulación, alcanzada por la síntesis de balanceo de glucosa o absorción contra la utilización.

homoglicano (homopolisacárido). Polímero de carbohidratos cuyos residuos están compuestos por un solo tipo de monosacárido.

homología. Similitud de genes o proteínas como resultado de la evolución a partir de un ancestro común.

hongos. Uno de los cinco reinos de la vida. Los hongos son en su mayoría organismos eucarióticos multicelulares que forman esporas. La levadura y los champiñones son ejemplos comunes de hongos.

hormona. Molécula reguladora sintetizada en una célula o glándula endocrina y transportada a otra célula o tejido. La célula o tejido objetivo contiene al receptor hormonal apropiado y responde a la hormona extracelular, o primer mensajero.

horquilla. **1**. Estructura secundaria adoptada por los polinucleótidos de una sola hebra que surge cuando las regiones cortas se pliegan sobre sí mismas y se forman enlaces hidrógeno entre las bases complementarias. También se le conoce como tallo-lazo. **2**. Un giro fuerte que conecta dos hebras β consecutivas de un polipéptido.

horquilla de replicación. La unión con forma de Y donde el molde de ADN de doble hebra se desenrolla y las nuevas hebras de ADN se sintetizan durante la replicación.

HPLC. Ver cromatografía líquida de alta presión.

IDL. Ver lipoproteínas de densidad intermedia.

in vitro. Que ocurre bajo condiciones artificiales, como las de laboratorio, y no en condiciones fisiológicas o en un organismo intacto.

in vivo. Que ocurre dentro de una célula u organismo viviente.

inanición. Periodo durante el cual no se ingiere comida ni se absorbe. Durante la inanición, que empieza alrededor de las 16 horas después de haber consumido el último alimento en los humanos, la glucosa de la sangre se origina de la gluconeogénesis hepática y renal, y los ácidos grasos y las proteínas se tienen que catabolizar para obtener energía.

índice de control respiratorio. La proporción en la mitocondria de la velocidad del consumo de oxígeno en presencia de ADP con respecto a la velocidad en ausencia de ADP.

inductor. Ligando que se une e inactiva a un represor, y por lo tanto incrementa la transcripción del gen controlado por el represor.

ingeniería genética. Ver tecnología de ADN recombinante.

inhibición competitiva. Inhibición reversible de una reacción catalizada por una enzima mediante un inhibidor que impide la unión de sustrato.

inhibición de retroalimentación acumulativa. Inhibición de una enzima que cataliza una etapa anterior en varias rutas biosintéticas mediante los intermediarios o productos finales de esas rutas. El grado de inhibición aumenta a medida que se unen más inhibidores.

inhibición no competitiva. Inhibición de una reacción catalizada por enzimas mediante un inhibidor reversible que se une sólo a un complejo sustrato-enzima, no a la enzima libre.

inhibición por retroalimentación. La inhibición de una enzima que cataliza uno de los primeros pasos en una ruta metabólica mediante un producto final de la misma ruta.

inhibidor enzimático. Compuesto que se une a una enzima e interfiere con su actividad al impedir ya sea la formación del complejo ES o su conversión en E + P.

inmunoglobulina. Ver anticuerpo.

interacción alostérica. La modulación de actividad de una proteína que ocurre cuando una molécula se une al sitio regulador de la proteína.

interacción carga-carga. Interacción electroestática no covalente entre dos partículas cargadas.

interacción electroestática. Término general para la interacción electrónica entre partículas. Las interacciones electroestáticas incluyen interacciones carga-carga, enlaces hidrógeno y fuerzas de van der Waals.

interacción hidrofóbica. Interacción débil, no covalente entre moléculas no polares o sustitutivas que resultan de una fuerte asociación de las moléculas de agua entre sí. Tal asociación provoca la protección o exclusión de las moléculas no polares contra un entorno acuoso.

interacciones de apilamiento. Fuerzas débiles no covalentes entre bases adyacentes o pares de bases en ácidos nucleicos de hebra única o de doble hebra, respectivamente. Las interacciones de apilamiento contribuyen a la forma helicoidal de los ácidos nucleicos.

intrón. Secuencia interna de nucleótidos que se suprime en la transcripción del ARN primario durante el procesamiento. El término intrón también se refiere a la región del gen que corresponde al intrón ARN correspondiente. (Cf., exón).

intrón de autocorte y empalme. Intrón extirpado en una reacción mediante el mismo precursor del ARN.

invasión de hebra. El intercambio de hebras individuales de ADN a partir de dos moléculas con muescas que tienen secuencias homólogas de nucleótidos.

ion esencial. Ion necesario como cofactor de la actividad catalítica de ciertas enzimas. Algunos iones esenciales, llamados iones activadores, están unidos de manera reversible a enzimas y muchas veces participan en la unión de sustratos, mientras que los iones metálicos con enlaces fuertes, con frecuencia participan directamente en direcciones catalíticas.

ionóforo. Compuesto que facilita la difusión de iones a través de las bicapas y membranas gracias a que sirve como un transportador iónico móvil o a que forma un canal para el paso iónico.

isoenzimas. Ver isozimas.

isomerasa. Enzima que cataliza una reacción de isomerización, un cambio en la geometría o estructura dentro de una molécula.

isopreno. Molécula de cinco carbonos insaturados y ramificados, que forma la unidad estructural básica de todos los isoprenoides, incluyendo los esteroides y las vitaminas lípidas.

isoprenoides. Lípido relacionado estructuralmente al isopreno.

isozimas. Diferentes proteínas de una sola especie biológica que catalizan la misma reacción. También conocidas como isoenzimas.

jabón. Sal de metal alcalino de ácidos grasos de cadena larga. Los jabones son un tipo de detergente.

joule (J). Cantidad de trabajo realizado, o energía requerida, mediante una fuerza de un newton que actúa a través de una distancia de 1 m. Un joule es igual a 0.24 calorías.

jugo pancreático. Solución de cloruro de sodio, zimógenos y enzimas digestivas secretadas por el páncreas durante la digestión. El jugo pancreático también puede contener bicarbonato de sodio.

K_a. Ver constante de disociación ácida.

kb. Ver par kilobase.

k_{cat}. Ver constante catalítica.

k_{cat}/K_m. Constante de velocidad de segundo orden para la conversión de una enzima y sustrato a una enzima y producto a bajas concentraciones de sustrato. La relación de k_{cat} con respecto a K_m, cuando se utiliza para comparar varios sustratos, se denomina constante de especificidad.

k_{eq}. Ver constante de equilibrio.

K_i. Ver constante de inhibición.

K_m. Ver constante de Michaelis.

K_{tr}. Ver constante de transporte.

K_w. Ver producto iónico del agua.

lamela del tilacoide. Ver membrana tilacoide.

lamela estromal. Regiones de la membrana tilacoide que están en contacto con el estroma.

lamelas de grana. Regiones de membrana tilacoide ubicadas dentro de los gránulos que no están en contacto con el estroma.

lámina β. Estructura secundaria común de las proteínas compuesta por cadenas polipeptídicas entre el oxígeno del carbonilo de un enlace peptídico y el hidrógeno amida de otro en la misma o una cadena polipeptídica adyacente. Los enlaces por puente de hidrógeno son casi perpendiculares a las cadenas polipeptídicas extendidas, las cuales pueden ser paralelas (que corren en la misma dirección de *N*- a- *C*- terminal) o antiparalelas (que corren en direcciones opuestas).

lazo. Región polipeptídica que conecta estructuras secundarias dentro de una molécula de proteína y proporciona cambios direccionales necesarios para que una proteína globular logre su forma compacta. Los lazos contienen de dos a 16 residuos. Los lazos cortos hasta cinco residuos y con frecuencia se denominan giros.

LDL. Ver lipoproteínas de baja densidad.

lectina. Proteína vegetal que une sacáridos específicos en las glucoproteínas.

LHC. Ver complejo recolector de luz.

liasa. Enzima que cataliza la reacción de eliminación no hidrolítica o no oxidativa, de un sustrato, con la generación de un enlace doble. En dirección inversa, una liasa cataliza la adición de un sustrato a un enlace doble de un segundo sustrato.

librería de cADN. Librería de ADN construida a partir de copias de cADN de todo el ARNm en un tipo celular determinado.

librería de ADN. Conjunto de moléculas de ADN recombinante generado mediante la unión en vectores de todos los fragmentos de una muestra de ADN.

librería genómica. Librería de ADN construida mediante la fragmentación y clonación de todo el ADN del genoma de un organismo.

ligando. Molécula, el grupo o ion que se une de manera no covalente a otra molécula o átomo.

ligasa. Enzima que cataliza la unión, o ligadura de los sustratos. Las reacciones de ligadura requieren la entrada de energía potencial química por parte de un nucleósido trifosfato como ATP. Las ligasas comúnmente se denominan sintetasas.

lipasa. Enzima que cataliza la hidrólisis de los triacilgliceroles.

lípido. Un compuesto orgánico insoluble en agua (o moderadamente soluble) encontrado en los sistemas biológicos, que se puede extraer mediante el uso de solventes orgánicos relativamente no polares.

lipólisis. La hidrólisis metabólica de los triacilgliceroles.

lipopolisacárido. Macromolécula compuesta por un lípido A (disacárido de residuos de glucosamina fosforilada con ácidos grasos adheridos) y un polisacárido. Los lipopolisacáridos se encuentran en la membrana externa de una bacteria gramnegativa. Estos compuestos se liberan a partir de la lisis que experimentan las bacterias y son tóxicos para los humanos y otros animales. También se denominan endotoxinas.

lipoproteína. Macromolécula ensamblada de moléculas de lípido y proteína con un centro hidrofóbico y una superficie hidrofílica. Los lípidos son transportados mediante lipoproteína.

lipoproteínas de alta densidad (HDL). Tipo de lipoproteínas plasmáticas enriquecidas en proteínas, que transportan colesterol y ésteres de colesteril de los tejidos hacia el hígado.

lipoproteínas de baja densidad (LDL). Tipo de proteína plasmática formada durante la descomposición de las IDLs y son ricas en colesterol y ésteres colesteril.

lipoproteínas de densidad intermedia (IDL). Tipo de lipoproteínas plasmáticas formadas durante la descomposición de las VLDLs.

lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Un tipo de lipoproteína plasmática que transporta triacilgliceroles, colesterol y colesteril ésteres del hígado a los tejidos.

liposoma. Una vesícula sintética formada por una bicapa de fosfolípido, que encierra un compartimiento acuoso.

lisofosfoglicérido. Lípido anfipático producido cuando una de dos mitades de acil graso de un glicerofosfolípido se elimina hidrocatalíticamente. Las bajas concentraciones de lisofosfoglicéridos son intermediarios metabólicos, mientras que las altas concentraciones desestabilizan las membranas, con lo que ocasionan que las células se dividan.

lisosoma. Organelo digestivo especializado en las células eucarióticas. Los lisosomas contienen una variedad de enzimas que catalizan la descomposición de los biopolímeros celulares, como proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos, y la digestión de grandes partículas, como algunas bacterias ingeridas por la célula.

lumen. Espacio acuoso encerrado por una membrana biológica como la membrana del retículo endoplásmico o la membrana tilacoide.

mapa de restricción. Diagrama que muestra el tamaño y distribución de los fragmentos producidos a partir de una molécula de ADN mediante la acción de diversas endonucleasas de restricción.

marcación de afinidad. Proceso por el cual una enzima (u otra macromolécula) se inhibe covalentemente mediante una reacción con una molécula que interactúa específicamente con el sitio activo (u otro sitio de enlace).

marcador de genes. Gen, con frecuencia transportado por un vector de clonación, que se puede utilizar para distinguir entre las células anfitrionas que transportan al vector y aquellas que no lo son.

marco de lectura. La secuencia de codones no imbricados en una molécula de ARNm que especifica la secuencia de aminoácidos. El marco de lectura de una molécula de ARNm se determina por la posición en la que comienza la traducción; por lo general un codón AUG.

marco de lectura abierto. Tramo de tripletas de nucleótido que no contienen codones de terminación. Regiones codificantes de proteínas son ejemplos de marcos de lectura abiertos.

masa molar. El peso en gramos de un mol de compuesto.

masa molecular relativa (M_r). La masa de una molécula relativa a 1/12 de la masa de ^{12}C. No hay unidades asociadas con los valores de la masa molecular relativa.

matriz. Ver matriz mitocondrial.

matriz mitocondrial. Fase parecida al gel encerrada por la membrana interna de una mitocondria. La matriz mitocondrial contiene muchas enzimas que intervienen en el metabolismo aeróbico de energía.

mecanismo cinético. Esquema utilizado para describir las secuencias de pasos de una reacción catalizada por enzimas multisustrato.

mecanismo de cambio de unión. Mecanismo propuesto para la fosforilación del ADP y la liberación de ATP a partir de la F_OF_1 ATP sintasa. El mecanismo propone tres conformaciones diferentes de sitio de unión para la ATP sintasa: un sitio abierto a partir del cual la ATP haya sido liberada, un sitio de unión tensa que es activo catalíticamente, y un sitio de unión suelta entre ADP y P_i, el cual es inactivo en la catálisis. El paso interior de los protones a través del complejo ATP sintasa a la matriz mitocondrial provoca que el sitio abierto se convierta en uno suelto, y fija el ADP y P_i, para convertirse en sitio tenso; y el sitio portador del ATP se convierte en un sitio abierto.

mecanismo de reacción. Eventos moleculares o atómicos graduales que ocurren durante las reacciones químicas.

membrana. Bicapa lipídica que contiene proteínas asociadas que sirven para delinear y dividir en compartimientos las células u organelos. Las membranas biológicas también son el sitio de muchos procesos bioquímicos importantes relacionados con la transducción energética y la señalización intracelular.

membrana biológica. Ver membrana.

membrana plasmática. Membrana que rodea el citoplasma de una célula y por lo tanto define su perímetro.

membrana tilacoide. Una red de membrana continua y altamente plegada suspendida en la matriz acuosa del cloroplasto. La membrana tilacoide es el sitio donde se presentan las reacciones dependientes de la luz de la fotosíntesis, la cual causa la formación de NADPH y ATP. También conocida como lamela del tilacoide.

metabolismo. Suma de reacciones bioquímicas totales llevadas a cabo por un organismo.

metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM). Secuencia modificada de reacciones de asimilación de carbono, utilizada principalmente por las plantas en entornos áridos para reducir la pérdida de agua durante la fotosíntesis. En estas reacciones, el CO_2 se consume de noche, lo que origina la formación de malato. Durante el día, el malato se descarboxila, y libera CO_2 para consumirse en el ciclo reductivo de las pentosas fosfato.

metabolismo intermediario. Reacciones metabólicas mediante las cuales las pequeñas moléculas de las células se interconvierten.

metabolito. Intermediario en la síntesis o degradación de los biopolímeros y sus unidades componentes.

metaloenzima. Enzima que contiene uno o más iones metálicos unidos firmemente. En algunos casos, algunos iones metálicos constituyen parte del sitio activo de la enzima y son participantes activos en la catálisis.

micela. La agregación de moléculas anfipáticas en las cuales las porciones hidrofílicas de las mo-

léculas se proyectan en el entorno acuoso y las porciones hidrofóbicas se asocian entre sí en el interior de la estructura para minimizar el contacto con las moléculas de agua.

micela mixto. Micela que contiene más de un tipo de molécula anfipática.

microfilamento. Ver filamento de actina.

microscopía electrónica de crio-fractura. Técnica utilizada para visualizar la estructura de las membranas biológicas. Durante la crio-fractura, la muestra de membrana se congela rápidamente y después se divide a lo largo de la interfase entre las hojillas de la bicapa lipídica. Después, la superficie de membrana expuesta se recubre con una delgada capa metálica, lo que produce una réplica de la superficie de la hojilla, la cual se puede visualizar mediante un microscopio electrónico.

microscopía inmunofluorescente. Técnica para visualizar componentes celulares mediante la marcación de ligandos o anticuerpos fluorescentes específicos.

microtúbulo. Filamento proteínico compuesto por heterodímeros de tubulina a y b. Los microtúbulos son componentes de la red citoesquelética y pueden formar estructuras capaces de movimiento dirigido.

migración de las ramas. Movimiento de un entrecruzamiento, o punto de rama, que da como resultado un intercambio adicional de hebras de ADN durante la recombinación.

mitocondria. Un organelo que es el sitio principal del metabolismo oxidante de energía en la mayoría de las células eucarióticas. Las mitocondrias contienen una membrana exterior y una interior, y ésta está plegada característicamente en crestas.

modelo de mosaico fluido. Modelo propuesto para la estructura de las membranas biológicas. En este modelo, la membrana se representa como una estructura dinámica en la que los lípidos y las proteínas de membrana (tanto integrales como periféricas) giran y experimentan una difusión lateral.

modificación cotraduccional. Modificación covalente de una proteína que ocurre antes de que la elongación del polipéptido se complete.

modificación de postraduccional. Modificación covalente de una proteína que ocurre después de que la síntesis del polipéptido se ha completado.

modulador alostérico. Una biomolécula que se une al sitio regulador de una proteína alostérica, y con ello modula su actividad. Un modulador alostérico puede ser un activador o un inhibidor. También se le llama efector alostérico.

molaridad efectiva. Expresión de la reactividad mejorada de una reacción química intramolecular en comparación con una reacción intermolecular similar.

molécula anfipática. Molécula que tiene regiones hidrofóbicas e hidrofílicas.

molécula heterocíclica. Molécula que contiene una estructura anular compuesta por más de un tipo de átomos.

moléculas de ARNt isoaceptor. Diferentes moléculas de ARNt que unen al mismo aminoácido.

monómeros. **1**. Pequeño compuesto que se convierte en un residuo cuando se polimeriza con otros monómeros. **2**. Subunidad individual de una proteína multisubunidad.

monosacáridos. Azúcar simple de tres o más átomos de carbono con la fórmula empírica $(CH_2O)_n$.

motivo. Combinación de estructura secundaria que aparece en varias proteínas diferentes. También conocida como estructura supersecundaria.

M_r**.** Ver masa molecular relativa.

mucina. Glucoproteína de peso molecular alto *O*-unida que contiene hasta 80% de carbohidratos por masa. Las mucinas son moléculas extendidas negativamente cargadas que contribuyen a la viscosidad del moco, del fluido encontrado sobre las superficies gastrointestinales, genitourinarias y del tracto respiratorio.

mutación. Cambio hereditario en la secuencia de nucleótidos en el ADN que ocasiona la alteración permanente de la información genética.

mutación de desfase del marco. Alteración en el ADN ocasionada por la inserción o supresión de varios nucleótidos que no son divisibles entre tres. La mutación de desfase del marco cambia el marco de lectura de la molécula ARNm correspondiente y afecta la traducción de todos los codones de flujo descendente de la mutación.

mutación sin sentido. Alteración en el ADN que implica la sustitución de un nucleótido por otro, mediante el cambio de un codón que especifica un aminoácido por un codón de terminación. La mutación sin sentido produce la terminación prematura de la síntesis de una proteína.

mutagénesis sitio-dirigida. Procedimiento *in vitro* mediante el cual un residuo de nucleótido particular en un gen se reemplaza por otro, lo que da como resultado la producción de una secuencia proteínica alterada.

mutágeno. Agente que puede causar daño al ADN.

nucleasa. Enzima que cataliza la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster de una cadena de nucleótidos. Las nucleasas se pueden clasificar como endonucleasas y exonucleasas.

núcleo. Organelo que contiene el principal material genético de las células eucariotas y funciona como el sitio más importante para la síntesis y procesamiento del ARN.

nucleófilo. Especie rica en electrones que está negativamente cargada o que contiene pares electrónicos sin compartir y es atraída hacia especies químicas positivamente cargadas o deficientes en electrones (electrófilos).

nucléolo. Región en el núcleo eucariótico donde las transcripciones de ARN son procesadas y los ribosomas ensamblados.

nucleósido. Purina o pimidina unida por un enlace *N*-glucosídico a una ribosa o desoxirribosa.

nucleosoma. Complejo de proteína-ADN que forma la unidad fundamental de la cromatina. Un nucleosoma está compuesto por una partícula central de nucleosomas (aproximadamente 146 pares de bases de ADN más un octámero de histona). El ADN vinculador o internucleosomal (aproximadamente 54 pares de bases) y la histona H1 (la cual une la partícula central y al ADN vinculador).

nucleótido. El éster fosfato de un nucleósido compuesto por una base de nitrógeno unida a una pentosa fosfato. Los nucleótidos son unidades monoméricas de ácidos nucleicos.

número de recambio. Ver constante catalítica.

***N*-terminal.** Residuo aminoácido que porta un grupo amino-α libre a un extremo de una cadena peptídica. En algunas proteínas, el *N*-terminal se bloquea por acilación. Por lo general, al residuo de *N*-terminal se le asigna el número de residuo uno. También se le conoce como amino terminal.

oligómero. Molécula multisubunidad cuya distribución de subunidades siempre tiene una estequiometría definida y casi siempre presenta simetría.

oligonucleótido. Polímero de varios residuos de nucleótidos (hasta aproximadamente 20) unidos por enlaces fosfodiéster.

oligopéptido. Polímero de 2 a aproximadamente 20 residuos de monosacáridos unidos por enlaces peptídicos.

oligosacáridos. Polímero de 2 a 20 residuos de monosacáridos unidos por enlaces glucosídicos.

oncogén. Gen cuyo producto tiene la capacidad de transformar las células eucariotas normales en células cancerosas. Algunos oncogenes son transportados por los virus.

operador. Secuencia de ADN a la cual se une una proteína represora específica, y por lo tanto, bloquea la transcripción de un gen u operón.

operones. Unidad de transcripción bacterial compuesta por varias regiones codificantes diferentes, cotranscritas a partir de un promotor.

orden cinético. La suma de exponentes en una ecuación de velocidad, que refleja cuántas moléculas están reaccionando en el paso más lento de la reacción. También conocida como orden de reacción.

orden de reacción. Ver orden cinético.

organelo. Cualquier estructura especializada circundada por una membrana dentro de una célula eucariota. Los organelos están organizados de manera peculiar para llevar a cabo diferentes funciones.

organismo transgénico. Organismo individual que porta el ADN recombinante integrado establemente en todas sus células.

órgano. Asociación de uno o más tejidos que realizan las funciones discretas dentro de un organismo multicelular.

origen de la replicación. Secuencia de ADN en la cual se inicia la replicación.

ósmosis. Movimiento de las moléculas de disolvente provenientes de una disolución menos concentrada hacia una disolución más concentrada y adyacente.

oxidación. La pérdida de electrones de una sustancia durante su transferencia a otra sustancia (agente oxidante). La oxidación puede asumir diversas formas, incluyendo la adición de oxígeno a un compuesto, la remoción de hidrógeno de un compuesto para crear un enlace doble, o un incremento en la valencia de un ion metálico.

oxidasa. Enzima que cataliza una reacción de reducción-oxidación en la cual el O_2 es el aceptor de electrones. Las oxidasas son miembros de la clase IUBMB de enzimas conocidas como oxidorreductasas.

oxidorreductasas. Enzima que cataliza una reacción de oxidación-reducción. Las oxidorreductasas se conocen como deshidrogenasas, oxidasas, peroxidasas, oxigenasas o reductasas.

oxigenación. Unión reversible de oxígeno a una macromolécula.

oxigenasa. Enzima que cataliza la incorporación de oxígeno molecular a un sustrato. Las oxigenasas son miembros de la clase IUBMB de enzimas conocidas como oxidorreductasas.

Δp. Ver fuerza protónmotriz.

$\Delta\psi$. Ver potencial de membrana.

PAGE. Ver electroforesis en gel de poliacrilamida.

par especial. Par especializado de moléculas de clorofila en centros de reacción que es el principal donador de electrones durante las reacciones dependientes de la luz de la fotosíntesis.

par iónico. Interacción electroestática entre grupos iónicos de carga opuesta en el interior de una macromolécula como una proteína globular.

par kilo base (kb). Unidad de longitud del ADN de doble hebra, equivalente a 1000 pares de bases.

pared celular. Cubierta externa mecánicamente resistente y porosa que rodea a la membrana plas-

mática de casi todas las células bacteriales, fúngicas o vegetales.

partícula central. Ver partícula central del nucleosoma.

partícula de reconocimiento de señal (SRP). Complejo ARN-proteína eucariótica que se une a un péptido recientemente sintetizado cuando éste es extraído del ribosoma. La partícula de reconocimiento de señal está implicada en el anclaje del ribosoma a la cara citosólica del retículo endoplásmico de manera que pueda ocurrir el desplazamiento de la proteína hacia el lumen.

partícula nucleosómica central. Complejo de proteínas-ADN compuesto por aproximadamente 146 pares de bases de ADN envuelto alrededor de un octámero de histonas (dos de cada H2A H2B H3 y H4).

paso determinante de la velocidad. El paso más lento en una reacción química. El paso determinante de la velocidad tiene la energía de activación más alta entre los pasos que llevan a la formación de un producto a partir del sustrato.

PCR. Ver reacción en cadena de la polimerasa.

peptidasa de señal. Proteína integral de membrana del retículo endoplásmico que cataliza el clivaje del péptido de señal de las proteínas desplazadas hacia el lumen.

peptidil-ARNt. La molécula de ARNt a la cual la cadena peptídica creciente se une durante la síntesis de proteínas.

peptidil transferasa. Actividad enzimática responsable de la formación de un enlace peptídico durante la síntesis de proteínas.

péptido. Dos o más aminoácidos unidos covalentemente en una secuencia lineal por enlaces peptídicos.

péptido de señal. Secuencia en la *N*-terminal de residuos en un polipéptido recientemente sintetizado que marca a la proteína para traslocarla a través de una membrana.

péptido líder. Péptido codificado por una porción de la región líder de ciertos operones regulados. La síntesis de un péptido líder es la base para la transcripción reguladora del operón completo mediante el mecanismo de atenuación.

peptidoglicano. Macromolécula que contiene una cadena heteroglicanos de ácidos alternantes *N*-acetilglucosamina y *N*-acetilmurámico unidos a péptidos unidos en grupos de diferente composición. Los péptidos son los principales componentes de las paredes celulares de muchas bacterias.

peroxidasa. Enzima que cataliza una reacción en la cual el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es el agente oxidante. Las peroxidasas son miembros de la clase IUBMB de enzimas conocidas como oxidorreductasas.

peroxisoma. Organelo en todos los animales y en muchas células vegetales que desempeña las reacciones de oxidación, algunas de las cuales producen el compuesto tóxico a peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las peroxisomas contienen la enzima catalasa, la cual cataliza la descomposición del H_2O_2 tóxico en agua y O_2.

peso molecular. Ver masa molecular relativa.

pH. Cantidad logarítmica que indica la acidez de una solución, es decir, la concentración de iones hidronio en una disolución. El pH se define como un logaritmo negativo de la concentración del ión hidronio.

pH fisiológico. El pH normal de la sangre humana, que es de 7.4.

***ϕ* (phi).** El ángulo de rotación en torno al enlace entre el carbono α y el nitrógeno de un grupo peptídico.

pH óptimo. En una reacción catalizada por enzimas, el pH en el punto de actividad catalítica máxima.

pI. Punto isoeléctrico.

pigmentos accesorios. Pigmentos diferentes a la clorofila, presentes en las membranas fotosintéticas. Los pigmentos accesorios incluyen los carotenoides y las ficobilinas.

pigmentos antena. Pigmentos absorbentes de la luz que están asociados con el centro de reacción de un fotosistema. Estos pigmentos pueden formar un complejo de antena independiente o pueden unirse directamente a las proteínas del centro de reacción.

piranosa. Estructura de monosacáridos que forma un anillo de seis miembros como resultado de la formación hemiacetal intramolecular.

pirimidina. Base nitrogenada que tiene un anillo cíclico entero que consiste en cuatro átomos de carbono y dos átomos de nitrógeno. La citosina, timina y uracilo, son pirimidinas sustituidas encontradas en los ácidos nucleicos (la citosina en el ADN y ARN, el uracilo en el ARN y la timina principalmente en el ADN).

pK_a. El valor logarítmico que indica la fortaleza de un ácido. pK_a se define como logaritmo negativo de la constante de disociación del ácido, K_a.

placa. Un área de muerte o lento crecimiento de las células bacteriales que indica la presencia de células infectadas por bacteriófago entre células no infectadas.

plantas. Uno de los cinco reinos de la vida. Las plantas son eucariotas multicelulares que poseen cloroplastos. Los principales grupos de plantas incluyen los musgos, helechos y plantas con floración.

plasmalógeno. Glicerofosfolípido que tiene una cadena de hidrocarburos unida al C-1 de glicerol 3-fosfato a través de una unión éter vinilo. Los plasmalógenos se encuentran en el sistema nervioso central, en el nervioso periférico y en el tejido muscular.

plásmidos. Una molécula de ADN relativamente pequeña, y extracromosomal de ADN capaz de replicación autónoma. Por lo general, los plásmidos son moléculas cerradas de ADN, circulares y de doble hebra.

pliegue. Combinación de estructuras secundarias que forman el centro de un dominio de proteína. Se han distinguido varios pliegues diferentes.

polar. Que tiene una distribución desigual de la carga. Una molécula o grupo funcional es polar si su centro de carga negativa no coincide con su centro de carga positiva.

polimorfismo en la longitud del fragmento de restricción (RFLP). Variación en la longitud de los fragmentos de ADN generados por la acción de las endonucleasas de restricción sobre el ADN genómico de diferentes individuos.

polinucleótido. Polímero de muchos (por lo general más de 20) residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos.

polirribosoma. Ver polisoma.

polisacárido. Polímero de muchos (por lo general más de 20) residuos monosacáridos unidos por enlaces glucosídicos. Las cadenas de polisacáridos pueden ser lineales o ramificadas.

polisoma. Estructura formada por la unión de muchos complejos de traducción a una molécula grande de ARNm. También conocido como polirribosoma.

poro. Ver canal.

posición tambaleante. La posición 5′ de un anticodón, donde se permite el apareamiento de bases diferente al de Watson-Crick con un nucleótido en ARNm. La posición tambaleante hace posible que la molécula de ARNt reconozca más de un codón.

potencial de membrana ($\Delta\psi$). Separación de carga a través de una membrana que resulta de las diferencias entre las concentraciones iónicas en ambos lados de la membrana.

potencial de reducción (E). Medida de la tendencia de una sustancia a reducir otras sustancias. Cuanto más negativo sea el potencial de reducción, mayor será la tendencia a donar electrones.

potencial de reducción estándar ($E^{\circ\prime}$). Una medida de la tendencia de una sustancia a reducir a otras sustancias bajo condiciones bioquímicas de estado estándar.

potencial de transferencia de grupo. Ver potencial de transferencia de grupo fosforilo.

potencial de transferencia de grupo fosforilo. La medida de la capacidad de un compuesto para transferir un grupo fosforilo a otro compuesto. En condiciones estándar, los potenciales de transferencia de grupo tienen los mismos valores que las energías libres estándar de la hidrólisis pero son opuestas en signo.

potencial eléctrico. Ver potencial de membrana.

precursor del ARNm. Tipo de moléculas de ARN sintetizadas por la ARN polimerasa II eucariota. Los precursores ARNm se procesan de manera postranscripcional para producir el ARN mensajero maduro.

presión osmótica. La presión necesaria para evitar el flujo de solvente desde una solución menos concentrada hasta una más concentrada.

primasa. Enzima en el primosoma que cataliza la síntesis de pequeñas piezas de ARN de aproximadamente 10 residuos de longitud. Estos oligonucleótidos son los cebadores para la síntesis de los fragmentos de Okazaki.

primosoma. Complejo multiproteínico, que incluye la primasa y la helicasa en *E. coli*, que cataliza la síntesis de los cebadores cortos de ARN necesarios para la síntesis discontinua de ADN de hebra rezagada.

procariota. Organismo, por lo general unicelular, que no contiene núcleo o membranas internas. (Cf. eucariota).

procesamiento cotranscripcional. Procesamiento del ARN que ocurre antes de que la transcripción se complete.

procesamiento de oligosacáridos. La adición catalizada por enzimas y la remoción de residuos de sacáridos durante la maduración de una glucoproteína.

procesamiento de postranscripcional. Procesamiento del ARN que ocurre después de que la transcripción se completa.

procesamiento de ARN. Las reacciones que transforman el ARN transcrito primario en una molécula madura de ARN. Los tres tipos generales de procesamiento de ARN incluyen la remoción de nucleótidos de ARN a partir de transcritos primarios, la adición de nucleótidos de ARN no codificados genéticamente y la modificación covalente de bases.

producto iónico del agua (K_w). Producto de la concentración de iones hidrógeno y iones hidróxido en una disolución acuosa, igual a $1.0 \times 10^{-14}\ M^2$.

proenzima. Ver zimógeno.

promotor. Región de ADN donde el ARN polimerasa se une durante la iniciación de la transcripción.

prostaglandina. Eicosanoide que tiene un anillo de ciclopentano. Las prostaglandinas son regula-

dores metabólicos que actúan en el entorno circundante de las células en las cuales se producen.

proteasa. Enzima que cataliza la hidrólisis de los enlaces peptídicos. Los sustratos fisiológicos de las proteasas son las proteínas.

proteasa ácida. Ver proteasa aspártica.

proteasa aspártica. Proteasa que contiene dos residuos de aspartato en el centro catalítico, uno de los cuales actúa como un catalizador básico y el otro, como un catalizador ácido. Las proteasas aspárticas tienen un pH óptimo de aproximadamente 2-4. También se conoce como proteasa ácida.

proteína. Biopolímero compuesto por una o más cadenas de polipéptidos. La función biológica de cada molécula de proteína depende no sólo de la secuencia de residuos de aminoácidos unidos covalentemente, sino también de su estructura tridimensional (conformación).

proteína alostérica. Una proteína cuya actividad está modulada por la unión de otra molécula.

proteína anclada por lípidos a membrana. Proteína de membrana que está atada a una membrana a través de un enlace covalente a una molécula lipídica.

proteína cinasa. Ver cinasa.

proteína de membrana integral. Proteína de membrana que penetra en el centro hidrofóbico de la bicapa lipídica y por lo general expande la bicapa por completo. También se conoce como proteína intrínseca de la membrana.

proteína de transferencia de grupo. Ver coenzimas de proteína.

proteína de unión a hebra sencilla (SSB). Una proteína que se une fuertemente a un ADN de una sola hebra, impidiendo que el ADN se repliegue sobre sí mismo para formar regiones de doble hebra.

proteína de unión del casquete (CBP). Factor de iniciación de traducción eucariota que interactúa con el casquete 5′ de una molécula de ARNm durante el ensamblado de un complejo de iniciación de la traducción.

proteína extrínseca de membrana. Véase proteína periférica de membrana.

proteína fosfatasa. Ver fosfatasa.

proteína G. Proteína que une los nucleótidos de guanina.

proteína globular. Tipo importante de proteínas, muchas de las cuales son hidrosolubles. Las proteínas globulares son compactas y casi esféricas, con cadenas polipeptídicas plegadas fuertemente. Por lo general, las proteínas globulares incluyen surcos o grietas que reconocen específicamente y se unen temporalmente a otros compuestos.

proteína intrínseca de la membrana. Ver proteína integral de la membrana.

proteína monotópica. Proteína integral de membrana anclada por un solo segmento transmembranal.

proteína periférica de membrana. Proteína de membrana ligada débilmente a la superficie interior o exterior de una membrana a través de interacciones iónicas y el enlace hidrógeno con las cabezas polares de los lípidos de membrana o con una proteína integral de membrana. También conocida como proteína extrínseca de membrana.

proteína politópica. Proteína integral de membrana anclada por segmentos transmembranales.

proteína transportadora del acilo (ACP). Una proteína (en procariotas) o un dominio de proteína (en eucariotas) que une intermediarios activados de la síntesis de ácidos grasos mediante un enlace tioéster.

proteína prenilada. Proteína anclada por lípidos que está unida covalentemente a una mitad isoprenoide vía el átomo de azufre de un residuo de cisteína en el *C*-terminal de la proteína.

proteína reguladora. Proteína implicada en la regulación de la expresión genética, por lo general en el punto de la iniciación de la transcripción. Los represores y los activadores son ejemplos de proteínas reguladoras.

proteínas de choque térmico. Proteína cuya síntesis se incrementa como respuesta a tensiones como la alta temperatura. Muchas proteínas de choque térmico son chaperonas, que también se expresan en ausencia de estrés.

proteínas fibrosas. Clase importante de proteínas hidrosolubles que se asocian a la formación de fibras largas. Muchas proteínas fibrosas son físicamente duras y proporcionan un soporte mecánico a las células individuales o a organismos enteros.

proteoglicano. Complejo de proteínas con cadenas de glucosaminoglicanos unidas de manera covalente a través de sus átomos de carbono anomérico. Hasta 95% de la masa de un proteoglicano puede ser glucosaminoglicano.

protistas. Uno de los 5 reinos de la vida. Las protistas son pequeñas eucariotas, por lo general unicelulares, que no se pueden clasificar en los otros tres reinos eucariotas (es decir, hongos, plantas y animales).

proto-oncogén. Gen eucariota que puede mutar para convertirse en un oncogén.

proyección de Fischer. Representación bidimensional de las estructuras tridimensionales de azúcares y compuestos relacionados. En una proyección de Fischer, el esqueleto del carbono se dibuja de manera vertical, con el C-1 en la parte superior. En un centro quiral, los enlaces horizontales se extienden hacia el observador y los enlaces verticales se alejan de él.

proyección de Haworth. Representación en la cual una molécula cíclica de azúcar se representa como un anillo plano que se proyecta de forma perpendicular con respecto al plano de la página. Las líneas sólidas representan la parte de la molécula que se extiende hacia el observador.

pseudo gen. Secuencia no expresada de ADN que evoluciona a partir de un gen codificante de proteínas. Los pseudo genes muchas veces contienen mutaciones en sus regiones de codificación y no pueden producir proteínas funcionales.

pseudo reacción de primer orden. Una reacción de reactivos múltiples que se lleva a cabo en condiciones donde la velocidad depende de la concentración de un solo reactivo.

ψ (psi). El ángulo de rotación en torno al enlace entre el carbono α y el carbono carbonilo de un grupo peptídico.

punto de fusión (T_m). El punto medio del rango de temperatura en el cual un ADN de doble hebra se convierte en un ADN de hebra única o una proteína se transforma de su forma nativa al estado desnaturalizado.

punto isoeléctrico (pI). El pH al cual una molécula zwiteriónica no migra en un campo eléctrico debido a que su carga neta es de cero.

purina. Base nitrogenada que tiene una estructura de dos anillos en la cual una pirimidina se funde para convertirse en imidazol. La adenina y guanina son purinas sustitutivas encontradas tanto en el ADN como en el ARN.

Q. Ver relación masa acción.

quilomicrón. Tipo de lipoproteínas plasmáticas que transporta triacilgliceroles, colesterol y colesteril ésteres del intestino delgado hacia los tejidos.

quimiautótrofo. Autótrofo que deriva su energía química mediante la oxidación de compuestos inorgánicos (cf. fotoautótrofo).

quimiheterótrofo. Organismo no fotosintético que requiere moléculas orgánicas como fuente de carbono y deriva su energía de moléculas orgánicas oxidantes.

quitina. Homopolímero lineal de residuos de *N*-acetilglucosamina unidos por enlaces β-(1 $\rightarrow$ 4). La quitina se encuentra en los exoesqueletos de los insectos y crustáceos y en las paredes celulares de la mayoría de los hongos y de muchas algas, y es el segundo compuesto orgánico más abundante de la Tierra.

radical libre. Molécula o átomo con un electrón no apareado.

radio de van der Waals. Tamaño efectivo de un átomo. La distancia entre los núcleos de dos átomos no enlazados en el punto de máxima atracción es la suma de sus radios de van der Waals.

reacción aleatoria. Reacción en la cual ni la unión de sustratos a una enzima ni la liberación de productos de la enzima sigue un orden obligatorio.

reacción anabólica. Reacción metabólica que sintetiza una molécula necesaria para el mantenimiento y crecimiento celular.

reacción anaplerótica. Reacción que reabastece los metabolitos eliminados en una ruta metabólica central.

reacción catabólica. Reacción metabólica que degrada una molécula para proporcionar piezas moleculares más pequeñas y energía a un organismo.

reacción cercana al equilibrio. Reacción en la cual el valor de la relación masa acción es cercano al valor de la constante de equilibrio. El cambio de energía libre para tal reacción es pequeño; por lo tanto, la reacción es reversible.

reacción de difusión controlada. Reacción que ocurre con cada colisión entre las moléculas del reactivo. En las reacciones catalizadas por enzimas, la relación k_{cat}/K_m alcanza un valor de 10^8 - 10^9 $M^{-1}s^{-1}$.

reacción de orden cero. Reacción cuya velocidad es independiente de la concentración del reactivo.

reacción de ping-pong. Reacción en la cual una enzima se une a un sustrato y libera un producto, dejando una enzima sustituida que entonces se une a un segundo sustrato y libera un segundo producto, con lo que restaura la enzima a su forma original.

reacción de primer orden. Reacción cuya velocidad es directamente proporcional a la concentración de un solo reactivo.

reacción de segundo orden. Reacción cuya velocidad depende de las concentraciones de dos reactivos.

reacción de transferencia de grupo. Reacción en la cual un sustituto o grupo funcional se transfiere de un sustrato a otro.

reacción en cadena de polimerasa (PCR). Método para amplificar la cantidad de ADN en una muestra y enriquecer una secuencia particular de ADN en una población de moléculas de ADN. En la reacción en cadena de la polimerasa, los oligonucleótidos complementarios a los extremos de la secuencia deseada de ADN se utilizan como cebadores para múltiples rondas de síntesis de ADN.

reacción enzimática. Reacción catalizada por un catalizador biológico, una enzima. Las reacciones enzimáticas son 10^3 a 10^{17} veces más rápidas que las reacciones correspondientes sin catalizar.

reacción metabólicamente irreversible. Reacciones en las cuales el valor de la relación acción masa es dos o más órdenes de magnitud menor que el valor de la constante de equilibrio. El cambio de la energía libre para tal reacción es un número negativo grande; así, la reacción es esencialmente irreversible.

reacción ordenada. Reacción en la cual tanto la unión de sustratos a una enzima como la liberación de productos de la enzima siguen un orden obligatorio.

reacciones acopladas. Dos reacciones metabólicas que comparten un intermediario común.

reacciones dependientes de la luz. Ver reacciones luminosas.

reacciones independientes de la luz. Ver reacciones oscuras.

reacciones luminosas. Reacciones fotosintéticas en las cuales los protones derivados del agua se utilizan en la síntesis quimiosmótica del ATP a partir de ADP + P_i y un ion hidruro del agua reduce en NADPH. También se les conoce como reacciones dependientes de la luz.

reacciones oscuras. Reacciones fotosintéticas en las cuales el NADPH y ATP se utilizan para reducir el CO_2 a carbohidrato. También conocidas como reacciones independientes de la luz.

recambio. El estado estable metabólico dinámico en el cual las moléculas son degradadas y reemplazadas por moléculas recientemente sintetizadas.

receptor. Proteína que une un ligando específico, como una hormona, y que produce alguna respuesta celular.

recombinación. Ver recombinación genética.

recombinación genética. El intercambio o transferencia de ADN de una molécula de ADN a otra. (Cf. recombinaciones homólogas).

recombinación homóloga. Recombinación entre moléculas de ADN que tienen secuencias estrechamente relacionadas (es decir, homólogas). Ésta es la forma estándar de recombinación que ocurre entre cromosomas en las células eucarióticas.

recombinación no homóloga. Recombinación entre secuencias no relacionadas que no comparten una similitud de secuencia importante.

reducción. La ganancia de electrones por parte de una sustancia a través de la transferencia de otra sustancia (agente reductor). Las reducciones pueden asumir diferentes formas, incluyendo la pérdida de oxígeno de un compuesto, la adición de hidrógeno a un enlace doble de un compuesto, o la disminución en la valencia de un ion metálico.

reductasa. Ver oxidorreductasas.

región -35. Secuencia encontrada dentro del promotor de algunos genes procarióticos de aproximadamente 30 a 35 pares de bases en la corriente ascendente del sitio de iniciación de transcripción.

región líder. Secuencia de nucleótidos que yacen entre el sitio de inicio de la transcripción y la primera región codificante de un operón.

región nucleoide. Región dentro de una célula procariota que contiene el cromosoma.

reguladores locales. Tipo de eicosanoide de vida corta que ejerce sus efectos reguladores cerca de las células en las cuales se reproducen.

regulón. Grupo de operones o genes regulados de manera coordinada.

relación acción masa (*Q*). Relación de concentraciones de productos con respecto a las concentraciones de reactivos en una reacción.

relación P:O. Proporción de moléculas de ADP fosforilado con respecto a los átomos de oxígeno reducido durante la fosforilación oxidativa.

renaturalización. La restauración de la conformación activa de una macromolécula biológica, y que por lo general da como resultado la restauración de la actividad biológica.

reparación del mal apareamiento. Restauración de la secuencia de nucleótidos normal en una molécula de ADN que contiene bases mal apareadas. En la reparación del mal apareamiento, se identifica la hebra correcta, la hebra incorrecta se excisa y el ADN con bases apareadas correctamente y doble hebra se sintetiza mediante las acciones del ADN polimerasa y ADN ligasa.

reparación directa. La eliminación del ADN dañado mediante proteínas que reconocen los nucleótidos dañados y las bases mal apareadas, y los reparan sin romper el ADN o extraer la base.

reparación por escisión. La reversión del daño del ADN mediante endonucleasas reparadoras por escisión. Las lesiones generales que alteran la estructura de la hélice del ADN se reparan mediante el corte de cada lado de la lesión y la eliminación del ADN dañado. La brecha resultante de una sola hebra se llena con ADN polimerasa y se sella por la ADN ligasa.

repetición invertida. Secuencia de nucleótidos que se repite en orientación contraria dentro de la misma hebra de polinucleótidos. Una repetición invertida en el ADN de doble hebra puede ocasionar una estructura cruciforme.

replicación. La duplicación del ADN de doble hebra, durante la cual las hebras madres se separan y sirven como moldes para la síntesis de nuevas hebras. La replicación se lleva a cabo mediante el ADN polimerasa y factores asociados.

replicación semiconservativa. El modo de duplicar el ADN en el cual cada hebra sirve como molde para la síntesis de una hebra complementaria. El resultado son dos moléculas de doble hebra de ADN, y cada una contiene una hebra madre.

replisoma. Complejo multiproteínico que incluye al ADN polimerasa, primasa, helicasa, proteína de unión de una sola hebra y componentes adicionales. Los replisomas, ubicados en cada horquilla de replicación, desempeñan las reacciones de polimerización de la replicación cromosómica del ADN bacteriano.

represión de catabolitos. Mecanismo de regulación que genera velocidades mayores de trascripción de muchos genes bacterianos y operones cuando la glucosa está presente. Un complejo entre cAMP y la proteína reguladora de cAMP (CRP) activa la transcripción.

represor. Proteína de unión de ADN que impide la transcripción mediante el ARN polimerasa.

residuo. Un solo componente dentro de un polímero. La fórmula química de un residuo es la del monómero correspondiente menos los elementos de agua.

retículo endoplásmico. Una red membranosa compuesta por pequeños tubos y hojas unida a la membrana nuclear externa de las células eucariotas. Las regiones en el retículo endoplásmico cubiertas por ribosomas se conocen como retículo endoplásmico rugoso; las regiones que no tienen ribosomas adheridos se denominan retículo endoplásmico liso. El retículo endoplásmico está implicado en la clasificación y transporte de ciertas proteínas y la síntesis de lípidos.

retrovirus. Virus de ARN que infecta una célula eucariótica.

RFLP. Ver polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción.

ribonucleasa (RNasa). Enzima que cataliza la hidrólisis de ácidos ribonucleicos para formar oligonucleótidos y/o nucleótidos.

ribonucleoproteína. Complejo que contiene tanto al ácido ribonucleico como a la proteína.

ribonucleoproteína nuclear pequeña (snRNP). complejo de proteína-ARN compuesto por uno o dos moléculas específicas más cierto número de proteínas. La snRNP está implicada en el corte y empalme de los precursores de ARNm y en otros acontecimientos celulares.

ribosa. Monosacárido de 5 carbonos ($C_5H_{10}O_5$) que es el componente carbohidrato del ARN, ATP y numerosas coenzimas.

ribosoma. Gran complejo ribonucleoproteínico compuesto por moléculas de ARN ribosomal y proteínas. Los ribosomas son el sitio de la síntesis proteica.

ribozima. Molécula de ARN con actividad enzimática.

RNasa. Ver ribonucleasa.

ruta. Secuencia de reacciones metabólicas.

ruta anfibólica. Ruta metabólica que puede ser catabólica y anabólica.

ruta de la β-oxidación. Ruta metabólica que degrada los ácidos grasos en acetil-CoA, con lo que se produce NADH y QH_2 y por lo tanto genera grandes cantidades de ATP. Cada ciclo de β-oxidación de ácidos grasos está compuesto por cuatro pasos: oxidación, hidratación, oxidación mayor, y tiólisis.

ruta de las pentosas fosfato. Ruta mediante la cual la glucosa 6-fosfato se metaboliza para generar NADPH y ribosa 5-fosfato. En la etapa oxidativa de la ruta, la glucosa 6-fosfato se convierte en ribulosa 5-fosfato y CO_2, con lo que se generan dos moléculas de NADPH. En la etapa no oxidativa, la ribulosa 5-fosfato se puede isomerizar para convertirse en ribosa 5-fosfato o convertirse en intermediarios de la glucólisis. También se le conoce como desviación hexosa monofosfato.

ruta *de novo*. Ruta metabólica en la cual se forma una biomolécula a partir de moléculas precursoras simples.

ruta de recuperación. Una ruta en la cual un metabolito importante, como los nucleótidos de purina o pirimidina, se puede sintetizar a partir de una entidad molecular deformada, como una purina o pirimidina.

ruta C_3. Ver el ciclo reductivo de las pentosas fosfato (ciclo RPP).

ruta C_4. Ruta para la fijación del carbono en varias especies de plantas que minimiza la fotorrespiración al concentrar el CO_2. En esta ruta, el CO_2 se incorpora a los ácidos C_4 en las células mesofilo, y los ácidos C_4 se descarboxilan en las células de la vaina del haz, liberando CO_2 para su uso en el ciclo reductivo de la pentosa fosfato.

S. Ver entropía.

S. Ver unidad de Svedberg.

sacáridos. Ver carbohidratos

SDS-PAGE. dodecil sulfato de sodio-electroforesis en geles de poliacrilamida.

sección secuencial. Reacción enzimática en la cual todos los sustratos deben enlazarse a la enzima antes de que cualquier producto se libere.

secuencia consenso. Secuencia de los nucleótidos que se encuentra más comúnmente en cada posición dentro de una región de ADN o ARN.

secuencia de Shine-Dalgarno. Región rica en purina ubicada hacia arriba del codón de iniciación en las moléculas de ARNm procariótico. La secuencia Shine-Dalgarno se une a una secuencia rica en pirimidinas en el ARN ribosomal, y por lo tanto posiciona al ribosoma en el codón de iniciación.

segundo mensajero. Compuesto que actúa a nivel intracelular como respuesta a una señal extracelular.

selectina. Glucoproteína de membrana que contiene un dominio parecido a la lectina que une grupos oligosacáridos. El Ca^{2+} se requiere para que la selectina se una a los oligosacáridos.

serina proteasa. Proteasa con residuo de serina de sitio activo que actúa como nucleófilo durante la catálisis.

sinpuerto. El cotransporte de dos diferentes especies de iones o moléculas en la misma dirección a través de una membrana mediante una proteína transportadora.

sintasa. Nombre común de una enzima, muchas veces una liasa, que cataliza una reacción sintética.

síntesis de escape. Transcripción de bajo nivel de un gen u operón que ocurre incluso en la ausencia de inducción o activación. En el caso de operones reprimidos, la síntesis de escape es resultado de la disociación espontánea del represor durante intervalos breves.

sintetasa aminoacil-ARNt. Enzima que cataliza la activación y unión de un aminoácido específico al extremo 3′ de una molécula de ARNt correspondiente.

sintetasas. Enzima que cataliza la unión de dos sustratos y requiere la entrada de energía potencial química de un nucleósido de trifosfato. Las sintetasas son miembros de la clase de enzimas IUBMB conocidas como ligasas.

sistema de lanzadera de la carnitina. Ruta cíclica que introduce el acetil-CoA del citosol a la mitocondria mediante la formación y transporte de acil carnitina.

sistema de transporte del citrato. Ruta cíclica que ingresa el acetil-CoA de la mitocondria al citosol, con la oxidación del NADH citosólico a NAD+ y la reducción del NADP+ citosólico a NADPH. En cada ronda de la ruta, se consumen entre 1 y 2 moléculas de ATP.

sitio A. Sitio aminoacilo. El sitio en un ribosoma ocupado durante la síntesis de proteínas por una molécula aminoacil ARNt.

sitio activo. La porción de una enzima que contiene el sitio de unión del sustrato y los residuos de los aminoácidos implicados en la catalización de la conversión de un sustrato(s) a un producto(s). Por lo general, los sitios activos se ubican en las hendiduras que hay entre los dominios o subunidades de las proteínas o en los surcos sobre la superficie de las proteínas.

sitio alostérico. Ver sitio regulador.

sitio aminoacilo. Sitio A.

sitio de empalme. La secuencia conservada de nucleótido alrededor de un empalme exón-intrón. Incluye el lugar donde la molécula de ARN se divide durante la excisión del intrón.

sitio de pausa. Región de un gen donde la transcripción se detiene. La pausa se exagera en secuencias palindrómicas, donde el ARN recientemente sintetizado puede formar una estructura de horquilla.

sitio de ramificación. Punto dentro de un intrón que se une al extremo 5′ del intrón durante el corte y empalme de los precursores de ARNm.

sitio E. Sitio de salida. El sitio en un ribosoma a partir del cual un ARNt desaminoacilatado se libera durante la síntesis de proteínas.

sitio P. Sitio peptidilo. El sitio en un ribosoma ocupado durante la síntesis de proteína por una molécula de ARNt unida a la creciente cadena polipeptídica (ARNt peptidilo).

sitio peptidil. Ver sitio P.

sitio regulador. Sitio de unión de ligandos en una enzima reguladora que es distinto al sitio activo. Los moduladores alostéricos alteran la actividad enzimática al unirse al sitio regulador. También se conoce como sitio alostérico.

snARN. Ver ARN nuclear pequeño.

snRNP. Ver ribonucleoproteína nuclear pequeña.

solución alcalina. Ver disolución básica.

solución básica. Disolución que tiene un valor de pH mayor que 7.0. También llamada disolución alcalina.

solvatación. Estado en el cual una molécula o ion está rodeado por moléculas de solvente.

sonda. Ver sonda nucleótida.

sonda de oligonucleótido mixto. Tramos cortos de ADN que corresponden a cada una de las secuencias posibles que pueden codificar una secuencia de una proteína determinada. Una sonda de oligonucleótido mixto se utiliza para buscar en la librería de ADN la presencia de clon codificante de la proteína.

SRP. Ver partícula de reconocimiento de la señal.

SSB. Ver proteínas de unión de hebra única.

subclonación. Transferencia del ADN clonado entre vectores de clonación.

subunidad σ (subunidad sigma). Una subunidad del ARN polimerasa procariótico, que actúa como factor de iniciación de la transcripción mediante la unión a un promotor. Las diferentes subunidades σ son específicas para diferentes promotores. También conocida como factor σ.

superenrollado. Una distribución topológica que asume un ADN de doble hebra sobrembobinado o subembobinado. El subembobinado da origen a un superenrollado negativo; el sobrembobinado produce superenrollado positivo.

surco mayor. Surco amplio en la superficie de una doble hélice del ADN creado por el apilamiento de pares de bases y el giro resultante en el esqueleto azúcar-fosfato.

surco menor. El surco más estrecho sobre la superficie de la doble hélice del ADN creado por el apilamiento de pares de bases y el giro resultante en el esqueleto azúcar-fosfato.

surfactante. Ver detergente.

sustrato. Un reactivo en una reacción química. En las reacciones enzimáticas, los sustratos son influidos específicamente por las enzimas, las cuales catalizan la conversión de sustratos en productos.

tallo aceptor. La secuencia en el extremo 5′ y la secuencia cerca del extremo 3′ de la molécula de ARNt, los cuales tienen bases apareadas que conforman un tallo. El tallo aceptor es el sito de unión del aminoácido. También se conoce como tallo aminoácido.

tallo-lazo. Ver horquilla.

tecnología de ADN recombinante. Metodologías para aislar, manipular y amplificar secuencias identificables de ADN. También conocida como ingeniería genética.

tejido. Asociación de células que llevan a cabo las mismas funciones.

tejido adiposo. Tejido animal compuesto por células especializadas de almacenamiento de triacilglicerol conocidas como adipocitos.

tejido glicolítico obligatorio. Tejido con poca o con ninguna capacidad de metabolismo oxidativo y para el cual la glucosa es el único combustible útil.

temperatura de transición de fase (T_m). El punto medio del rango de temperatura en la cual los lípidos y otros agregados macromoleculares se convierten a partir de una fase o estado altamente ordenado (como en el gel) en un estado menos ordenado (como el cristal líquido).

teoría basada en la simetría. Ver teoría concertada de la cooperatividad y la regulación alostérica.

teoría concertada de la cooperatividad y regulación alostérica. Modelo de unión cooperativa de ligandos a proteínas oligoméricas. De acuerdo con la teoría concertada, el cambio en la conformación de una proteína debido a la unión de un sustrato o un modulador alostérico, cambia el equilibrio de conformación de la proteína entre T (conformación de baja afinidad por el sustrato) y R (conformación de alta afinidad por el sustrato). Esta teoría sugiere que todas las subunidades de las proteínas tienen la misma conformación, ya sea todas T o todas R. También se conoce como teoría basada en la simetría.

teoría del ligando inducido. Ver teoría secuencial de regulación alostérica y cooperativa.

teoría quimiosmótica. Teoría que propone que un gradiente de concentración protónica establecido durante la oxidación de sustratos proporciona la energía para impulsar procesos como la formación de ATP a partir de ADP y P_i.

teoría secuencial de la cooperatividad y regulación alostérica. Modelo de unión cooperativa de ligandos idénticos con proteínas oligoméricas. De acuerdo con la forma más sencilla de la teoría secuencial, la unión de un ligando puede generar un cambio en la estructura terciaria de una subunidad a la cual se une y puede alterar las conformaciones de las subunidades del entorno en diferentes grados. Sólo una conformación de subunidad tiene una alta afinidad con el ligando. También se conoce como teoría del ligando inducido.

terapia de reemplazo genético. Técnica en la cual se eliminan las células de un paciente que sufre de alguna deficiencia enzimática, el gen para la enzima originaria se transfiere al interior de las células en cultivo, y las células se regresan al paciente.

termodinámica. La rama de la ciencia física que estudia las transformaciones de calor y energía.

terpeno. Uno de varios compuestos isoprenoides encontrados en las plantas.

T_m. Ver punto de fusión y temperatura de fase de transición.

toma de huellas dactilares genéticas. Ver dactilografías genéticas del ADN.

topoisomerasa. Enzima que altera el superenrollado de una molécula de ADN mediante el clivaje del enlace fosfodiéster en una o ambas hebras, rebobinando el ADN y resellando la división. Algunas topoisomerasas se conocen como ADN girasas.

topología. **1.** Distribución de los segmentos intermembranales y la conexión de lazos en una proteína integral de membrana. **2**. La morfología general de una molécula de ácido nucleico.

torción. Ángulo de rotación entre residuos adyacentes dentro de una macromolécula helicoidal.

tracto gastrointestinal. Sistema digestivo de un animal. En el tracto gastrointestinal, los biopolímeros dietéticos, como el almidón y proteínas, se hidrolizan enzimáticamente hasta sus unidades monoméricas, y los monómeros se absorben.

traducción. La síntesis de un polipéptido cuya secuencia refleja la secuencia de nucleótidos de una molécula de ARNm. Los aminoácidos son donados por moléculas ARNt activadas, y el complejo de traducción cataliza la síntesis del enlace peptídico; el complejo está compuesto por ribosomas y otros factores.

traducción de muesca. Proceso en el cual el ADN polimerasa se une a un surco entre el extremo 3′ de

una cadena de ADN naciente y el extremo 5′ del siguiente ARN cebador, y cataliza la eliminación hidrolítica de ribonucleótidos utilizando la actividad 5′→ 3′ exonucleasa, y la reemplaza con desoxirribonucleótidos mediante la actividad 5′ → 3′polimerasa.

transaminasa. Enzima que cataliza la transferencia de un grupo amino de un α-aminoácido a un α-ceto ácido. Las transaminasas requieren de la coenzima piridoxal fosfato. También se denominan aminotransferasas.

transcripción. La copia de información biológica de una molécula de ADN de doble hebra a una molécula de ARN de hebra individual, catalizada por un complejo de transcripción compuesto por ARN polimerasa y factores asociados.

transcripción primaria. Molécula de ARN recientemente sintetizada antes de su procesamiento.

transcriptasa reversa. Tipo de ADN polimerasa que cataliza la síntesis de una hebra de ADN a partir de un molde de ARN.

transducción de señal. Proceso donde una señal extracelular se convierte a una señal intracelular mediante la acción de un receptor asociado a la membrana, un transductor y una enzima efectora.

transductor. El componente de una ruta de transducción de señal que combina la unión receptor-ligando con la generación de un segundo mensajero catalizado por una enzima efectora.

transfección. La introducción de ADN foráneo en la célula por medio de un virus o un vector fago.

transferasa. Encima que cataliza una reacción de transferencia de grupo. Las transferasas con frecuencia requieren una coenzima.

transformación. Ver transformación genética.

transformación genética. Proceso mediante el cual una célula consume el ADN intacto del exterior de la célula.

translocación de grupo. Tipo de transporte activo primario durante el cual las especies translocadas se modifican químicamente.

transiciones alostéricas. Los cambios en la conformación de una proteína entre el estado activo (R) y el estado inactivo (T).

transporte activo. El proceso por el cual un soluto se une específicamente a una proteína portadora y es transportado a través de una membrana en contra del gradiente de concentración del soluto. Es necesaria la energía para llevar a cabo el transporte activo. En el transporte activo primario, la fuente de energía puede ser la luz, el ATP o el transporte de electrones. La energía del transporte activo secundario se deriva de los gradientes de concentración iónica.

transporte cíclico de electrones. Secuencia modificada de los pasos de transporte electrónico en los cloroplastos, que opera para proporcionar ATP sin la formación simultánea de NADPH.

transporte electrogénico. Transferencia de solutos iónicos a través de una membrana mediante un proceso que genera una transferencia neta de carga, y por lo tanto crea cambios en el potencial de membrana.

transporte electroneutral. Transferencia de solutos iónicos a través de una membrana mediante un proceso que no genera transferencia neta de carga.

transporte pasivo. Proceso por el cual un soluto se une específicamente a una proteína portadora y es transportado a través de una membrana, que se mueve en dirección del gradiente de concentración de los solutos. El transporte pasivo ocurre sin gasto de energía. También se conoce como difusión facilitada.

transposón. Elemento genético móvil que salta entre los cromosomas o partes de cromosomas y aprovecha los mecanismos de recombinación. También se conoce como elemento invertible o integrón.

triacilglicerol. Lípido que contiene tres residuos de acil grasos esterificados en glicerol. Las grasas y los aceites son mezclas de triacilgliceroles. Antes se conocían como triglicéridos.

tríada catalítica. Los residuos de serina, histidina y aspartato en el sitio activo de las proteasas de serina y algunas otras hidrolasas. El residuo de serina es un catalizador covalente; el residuo de histidina es un catalizador ácido- base; y el residuo de aspartato alinea el residuo de histidina y estabiliza la forma protonada.

triglicéridos. Ver triacilgliceroles.

ubiquitina. Proteína altamente conservada en las células eucarióticas que está implicada en la degradación proteínica. La unión covalente de una o más unidades de ubiquitina a una proteína destina esa proteína para la hidrólisis intracelular.

unidad de masa atómica. La unidad de peso atómico igual a un 1/12 de la masa del isótopo ^{12}C del carbono. La masa del núclido ^{12}C es, por definición, exactamente de 12.

unidad de Svedberg (S). Una unidad que equivale a 10^{-13} segundos, utilizada para expresar el coeficiente de sedimentación, es decir, una medida de la velocidad a la cual una molécula grande o sedimentos de partículas se sedimentan en una ultracentrífuga. Los valores grandes de S por lo general indican masas grandes.

unión de Holliday. Región del cruce de hebras que resulta de la recombinación de dos moléculas de ADN homólogo de doble hebra.

unión fosfodiéster. Unión de ácidos nucleicos y otras moléculas en la cual dos grupos hidroxilo alcohólicos están unidos mediante un grupo fosfato.

unipuerto. Transporte de un solo tipo de soluto a través de una membrana mediante una proteína transportadora.

v. Ver velocidad.

v_0. Ver velocidad inicial.

vacuola. Organelo lleno de fluido en las células de plantas que constituye un almacén para agua, iones o nutrientes.

vector. Ver vector de clonación.

vector de clonación. Molécula de ADN que transporta un segmento de ADN foráneo. Un vector de clonación introduce ADN foráneo a una célula donde puede replicarse y algunas veces expresarse.

vector de expresión. Vector de clonación que permite que el inserto de ADN sea transcrito y traducido en una proteína.

vector de lanzadera. Vector de clonación que puede replicarse tanto en las células procariotas como en las eucariotas. Los vectores de lanzadera se utilizan para transferir moléculas de ADN recombinante entre las células procariotas.

velocidad (v). La velocidad de una reacción química, expresada como cantidad del producto formado por unidad de tiempo.

velocidad inicial (v_0). Velocidad de conversión del sustrato en producto o en las primeras etapas de una reacción enzimática, antes de formarse un producto apreciable.

velocidad máxima ($V_{máx}$). Velocidad inicial de una reacción cuando la enzima está saturada con el sustrato, es decir, cuando toda la enzima se asume la forma de un complejo enzima-sustrato.

vesícula de segregación. Vesícula que transporta proteínas destinadas para la secreción. Las vesículas de secreción emergen del aparato de Golgi y viajan a través de la membrana plasmática donde el contenido de las vesículas es liberado por exocitosis.

virus. Complejo de ácido nucleico y proteína capaz de invadir una célula anfitriona. Un virus se apodera de la maquinaria de replicación y transcripción de la célula anfitriona para replicarse a sí mismo, mediante el uso tanto de sus propios productos genéticos como los del gen anfitrión.

vitamina. Micronutriente orgánico que no se puede sintetizar por un animal y se debe obtener de los alimentos. Muchas coenzimas son derivadas de las vitaminas.

vitamina hidrosoluble. Un micronutriente orgánico soluble en agua. En específico, las vitaminas hidrosolubles incluyen las vitaminas B y, en el caso de los primates y algunos otros organismos, el ácido ascórbico (vitamina C).

vitamina lipídica. Compuesto polipropenilo formado principalmente por una larga cadena de hidrocarburos o anillo combinado. A diferencia de las vitaminas solubles en agua, las vitaminas lipídicas pueden almacenarse en los animales. Las vitaminas lipídicas incluyen las vitaminas A, D, E y K.

vitamina liposoluble. Ver vitamina lipídica.

VLDL. Ver proteína de muy baja densidad.

$V_{máx}$. Ver velocidad máxima.

YAC. Ver cromosoma artificial de la levadura.

ylid. Molécula orgánica que tiene cargas iónicas opuestas en átomos adyacentes unidos covalentemente.

Z-ADN. Conformación de secuencias de oligonucleótidos que contienen residuos de desoxicitidilato y desoxiguanilato. El Z-ADN es una doble hélice levógira que contiene aproximadamente 12 pares de bases por giro.

Z-esquema. Esquema en zigzag que ilustra los potenciales de reducción asociados con el flujo electrónico a través de transportadores electrones sintéticos.

zimógeno. Precursor catalíticamente inactivo de una enzima, el cual debe modificarse mediante proteólisis limitada para volverse enzimáticamente activo. También conocido como proenzima.

zwiterión. Molécula que contiene grupos cargados positiva y negativamente.

Índice

Los números indican las páginas en donde encontrará el término en el libro. La T al final de ellas señala que éste se localiza en una tabla, la F que lo encontrará en una figura.

A_0, 458F
A_1, 458F
A-ADN, 597F
abecuosa, 231T
abrazadera deslizante, 621, 622F
  en eucariotas, 631
abreviaturas, 25
  de ácidos grasos, 255
  de aminoácidos, 57
  de desoxinucleósidos, 587
  de estructura de ADN, 591-592
  de monosacáridos, 231T
  de residuos de aminoácidos, 67
  de ribonucleósidos, 588
aceites. *Ver* triacilgliceroles
acetaldehído
  a partir de piruvato, 342F
  a partir del catabolismo de la treonina, 543F
  en la reducción del etanol, 342F
acetales, 236
acetato
  a partir del acetil fosfato, 316-317
  en el ciclo del glioxilato, 408
  en la biosíntesis de la cisteína, 531
  en la síntesis del acetil-CoA, 316-317F, 408
  titulación de, 44F
  valores de K_a y pK_a del, 43T
acetato de *p*-bromofenilo, 172
acetilación, de histonas, 601
acetil-CoA, 305F, 315T, 341F
  carboxilación en la síntesis de ácidos grasos, 480
  concentraciones de metabolitos en el ciclo del ácido cítrico y, 406-407
  conversión a partir del piruvato, 385-391F
  conversión a partir del triptófano, 547-548F
  conversión de la lisina en, 548-549F
  conversión en acetoacetato, 515-516F
  en cetogénesis, 515
  en ciclo del ácido cítrico, 391T-393F
  en el catabolismo de aminoácidos, 540F, 543F, 544F, 546, 547, 548F
  en el catabolismo de la pirimidina, 579-580F
  en el ciclo del glioxilato, 407-409F
  en la degradación de la cadena ramificada de aminoácidos, 544F
  en la degradación de la treonina, 543F
  etapas en la síntesis de ácidos grasos a partir del, 480-484F
  formación de pirofosfato de isopentenil a partir de, 498F
  función en la gluconeogénesis, 360
  oxidación por el ciclo del ácido cítrico, 384, 391T-393F
  regulación del ciclo del ácido cítrico y, 404-405F
  síntesis del, 316-317F
  tioésteres de, 317-318
  transporte al citosol, 480
acetil-CoA carboxilasa, 216
  desactivación del, 494
  en la carboxilación del acetil-CoA, 480-481F
  en la desaturación de ácidos grasos, 484F
  en proteínas de transferencia de grupo, 216
  regulación de la oxidación de ácidos grasos y, 507-508
acetil-CoA sintetasa, 317F
acetil-CoA: ACP transacilasa, 481F
acetilcolina, 147
acetilcolinesterasa, 129F
  constante de velocidad aparente de segundo orden para, 167T
  número de recambio de la, 138T
  y gases nerviosos, venenos de toxicidad, 147
acetil-dihidrolipoamida, 387-388
acetoacetato
  a partir del catabolismo de aminoácido, 540F, 544F
  catabolismo del, 515
  conversión a partir de la fenilalanina y tirosina, 547F
  conversión al acetil-CoA, 515-516F
  en mitocondria, 513-516F
  estructura del, 513F
  síntesis del, 514-515F
acetoacetil-ACP, 481F
acetoacetil-CoA
  en el catabolismo del acetoacetato, 515F
  en la síntesis de cuerpos cetónicos, 514F, 515-516F
  en pirofosfato de isopentenil, 498F
acetona
  biosíntesis de la, 514-515F
  estructura de, 513F
  exceso en diabéticos, 516
2-ácido aminoacético. *Ver* glicina
ácido-2-amino-3-hidroxipropanoico, 54. *Ver también* serina
ácido 2-aminopropanoico, 53
ácido acético, como amortiguador, 47
ácido acético. *Ver* acetato
ácido acetilsalicílico (aspirina), 267
  búsqueda de un sustituto, 490
  efecto sobre las prostaglandinas, 489
ácido aldurónico, 241
ácido araquidónico, 266F
ácido ascórbico. *Ver* vitamina C
ácido aspártico. *Ver* aspartato
ácido carbónico, 43T, 48F, 122
ácido carboxílico, 65F
  fórmula general del, 5F
ácido clorhídrico, 41F
ácido conjugado, 41-42
ácido débil, 41T-46F
ácido dehidroascórbico, 195
ácido desoxirribonucleico. *Ver* ADN
ácido fórmico, 43T, 44, 209F
ácido fosfatídico, 487
ácido fosfórico, 43T, 46F, 47
ácido fuerte, 41
ácido glucurónico, abreviatura, 231T
ácido glutámico. *Ver* glutamato
ácido graso monoinsaturado, 255
ácido graso poliinsaturado, 255
ácido hialurónico, 241-243F
  estructura del, 237T, 242F
ácido idurónico, 231T
ácido láctico. *Ver* lactato
ácido lipoico, 212
ácido *N*-acetilmurámico(MurNAc), 179F, 243-244F
  abreviatura, 231T
  estructura de, 245F
ácido *N*-acetilneuramínico (NeuNAc), 231, 233
  abreviatura, 231T
  en gangliósidos, 263
  estructura de, 232F
ácido nicotínico (niacina), 194T, 197F
ácido poliprótico, 44
ácido propanoico, 53. *Ver también* alanina
ácido retinóico, 213
ácido ribonucleico. *Ver* ARN
ácido sulfúrico, 553
ácido úrico (2,6, 8-trioxopurina), 553
  catabolismo de, 574-578F
  catabolismo de la purina y, 574-578F
  estructura de, 549F, 558F
  síndrome de Lesch-Nyhan y, 576
ácido uridilato 5-oxiacético (cmo^{5}U), 673F
ácido β-hidroxibutírico, 553
ácido(s), 39
  conjugado, 41-42
  débil, 41F-47T
  fuerte, 41, 42
ácidos grasos, 253, 254F-258T, 480-485F
  absorción y movilización de, 509F-513T
  almacenamiento y movilización de, 507
  β-oxidación de, 498-506F, 508, 513
    cadena impar y ácidos grasos insaturados, 504-506
  cadena impar, β-oxidación de, 504-506F
  elongación y desaturación de, 484-485
  esenciales, 258
  esfingolípidos, 262-264
  estructura de, 256F, 257F
  función en el mantenimiento del nivel de glucosa, 379, 381
  glicerofosfolípidos, 259-261F
  nomenclatura de, 255T-256F
  oxidación de, 498-506
    generación de ATP a partir de, 502-503F
    regulación de, 507
  pK_a de, 254
  propiedades de, 255-256
  puntos de fusión, 255T, 256
  síntesis de, 299F, 480-485
    carboxilación del acetil-CoA, 480-481F

reacciones de, 481-483F
transporte del acetil-CoA a citosol, 480-482
triacilgliceroles, 258F
uniones, 4
ácidos grasos *cis*, 255T, 256, 257F
ácidos grasos de cadena impar, 504-506
ácidos grasos esenciales, 258
ácidos grasos insaturados, 255
β-oxidación de, 504-506F
ácidos grasos saturados, 255
oxidación β de, 499-500F
ácidos grasos trans, 256
ácidos monopróticos, 44
ácidos nucleicos, 2, 9-10F, 583-614. *Ver también* ADN; nucleósidos; ARN
bases heterocíclicas, 9
conformaciones de, 584F
definición, 583
descomposición de, 573F
estructuras de, 584F, 585F, 586F
hidrólisis de, 605-610F
alcalinos, 605-606F
*Eco*RI y, 610F
por endonucleasas de restricción, 608-609F
ribonucleasa catalizada, 605-607F
identificación de, 3
nucléotidos como piezas constitutivas de, 584F-589T
representaciones de, 9
sitios de unión del hidrógeno, 587F
ácidos siálicos, 231, 245-248F
acidosis, 41
acil-ACP, 480F
acilcarnitina, 501, 503F
acil-CoA graso
en β-oxidación, 499-500
transporte hacia la mitocondria, 499-500F
acil-CoA sintetasa, 483-484F, 499
acil-CoA, 494. *Ver también* acil-CoA graso
acil-CoA-deshidrogenasa
en el catabolismo de los aminoácidos, 505F-506, 544F
en la β-oxidación, 499-500F
1-acildihidroxiacetona fosfato, 491F
acilo, fórmula general del, 5F
aciltransferasa, 486F, 491-492F
aconitasa (aconitato hidratasa), 396-397, 410
en el ciclo del glioxilato, 408F
aconitato hidratasa. *Ver* aconitasa
acoplamiento, en fosforilación oxidativa, 415, 419
ACP. *Ver* proteína transportadora de acilo
actina, 53
actinomicina D, 61
activación por corrección anticipada, 302
activadores, 664
de enzimas, 150
de transcripción, 664F, 665
activadores alostéricos (moduladores alostéricos), 121, 302
adenilato ciclasa, 670F
adenilato cinasa, 561
adenilato. *Ver* AMP
adenilosuccinato, 578F
adenilosuccinato liasa, 559, 561-562F
adenilosuccinato sintetasa, 561-562F
adenina (6-aminopurina)
en la recuperación de purinas, 573-574F
enlaces de hidrógeno en ADN, 585-586
estructura de la, 9F, 196F, 558F, 585F, 690F
tautómeros, 586F
adenina fosforribosiltransferasa, 573F
adenina nucleótido translocasa, 435
adenosilcobalamina (5′-desoxiadenosilcobalamina)
como una coenzima, 195T, 210-211F, 504F
estructura de, 211F
adenosín 5'-monofosfato. *Ver* AMP
adenosín difosfato. *Ver* ADP
adenosín trifosfato. *Ver* ATP
adenosina
conformaciones de, 588F
desaminación de la, 177F
en el catabolismo de la metionina, 545F
en el catabolismo de la purina, 574-575
en la recuperación de la purina, 573F, 574F
estructura de, 574F, 588F
patrón de enlaces de hidrógeno en, 588F
adenosina desaminasa
análogo al estado de transición de, 176-177F
tasa de aceleración de, 140T
adenovirus, 1F
adipocitos
definición de, 258, 480
degradación del triacilglicerol en, 508F
regulación de ácidos grasos, oxidación y, 480
síntesis de ácidos grasos en, 507
adiposo café, 435
aditivos alimenticios, 67F
ADN (ácido desoxirribonucleico), 3, 10F
A-ADN, 597F
apareamiento de bases complementarias en, 593F
apareamiento de bases en el, 592-593F
B-ADN, 590, 593-594F, 595F
bacterial, 3
composición de las bases en, 589T
descubrimiento de, 583
desnaturalización de, 596
despurinación de, 635
doble hebra, 590-597F
columnas vertebrales azúcar-fosfato de, 594F
conformaciones de, 597F
desnaturalización de, 596
doble hélice a partir de hebras antiparalelas, 592-595
enlaces 3'-5'-fosfodiéster en, 590-592F
surcos mayor y menor en, 594F, 597
doble hélice de, 590-597F
en células eucariotas, 630T-634F
en cromatina, 599-604F
en procariotas, 17
espectro de absorción del, 596F
estructura, 592F
estructura helicoidal, 590-597F
formación de uniones fosfodiéster en, 590-592F
hidrólisis de, mediante nucleasas, 605-610F
ligador, 723
mapas de restricción de, 610-611
mutagénesis sitio dirigido del clonado, 743-744F
primeras investigaciones sobre, 583
puentes de hidrógeno en, 595, 596
rompimiento de, 608-611F
secuenciación de, 78F
sitio de unión, 666F
temperatura de fusión, 596
terminación roma en, 723
y código genético, 683-686F
y endonucleasas de restricción, 608-609F
y mutaciones, 634-635, 638
y superenrollamiento, 597-599F
Z-ADN, 597F
ADN complementario (ADNc), 729-730F
ADN fotoliasa, 635, 636F
ADN genómico, 720F, 721
ADN glicosilasas, 637
ADN ligasa
en la reparación del ADN, 636, 637F, 638F
en tecnología del ADN recombinante, 722-723F
fragmentos de Okazaki y, 624-626F
ADN polimerasa I
unión de fragmento de Okazaki y, 624-626F
y síntesis de ADNc, 729, 730F
ADN polimerasa III, 621
ADN polimerasas, 615. *Ver también* replicación del ADN; *ADN polimerasas específicas*
en células eucariotas, 631T
reparación de ADN y, 618, 634, 636, 637F, 638F
ADN superenrrollado, 597-599F
ADN transformador (T-ADN), 737, 738F
ADNc (ADN complementario), 729-730F
ADP (adenosín 5'-difosfato)
ADP-ADN intermediario, 626, 627F
ADP-glucosa, 372
adrenalina. *Ver* epinefrina
aducto de carbamato, 123F
agente oxidante, 319
agente reductor, 318
agentes caotrópicos, 108
α-globina, 117-118F
α-glucosidasas, 240
agrecan, 242-243
agrupamientos hierro-azufre (Fe-S)
como cofactor, 198F-199
en transporte de electrones, 421, 424, 425F, 426F, 427
potenciales de reducción estándar de, 423T
agua, 3, 26-51
como nucleófilo, 36-37F
densidad de, 29
en fotosíntesis, 456-457, 459
enlace hidrógeno de, 28-30F, 34-35F
exclusión de, en síntesis de biopolímeros, 37
hielo, propiedades generales de, 28-29F
insolubilidad de sustancias no polares en, 32-33F
ionización de, 37-39
metabolismo del ácido de las crasuláceas y conservación de, 474
movimiento a través de membranas, 280
polaridad de, 27F
propiedades de, 29-30
propiedades térmicas de, 29
solubilidad de sustancias iónicas y polares, 30-32F
agujero oxianión, 186F, 187F
α-hélice, 86F, 89
AICAR (aminoimidazol carboxamida ribonucleótido), 560F
AICAR transformilasa, 560F
AIR (aminoimidazol ribonucleótido), 560F, 561F
AIR carboxilasa, 560F
AIR sintetasa, 560F
ajuste inducido, 174-175
alanilserina, 66F
alanina
cadenas laterales, 58, 94
como precursor gluconeogénesis, 362, 363, 365
conversión a partir del triptófano, 547-548F
degradación de la, 541
en el catabolismo de los nucleótidos de pirimidina, 579-580F
en el catabolismo del triptófano, 547-548F
en el ciclo glucosa-alanina, 552-553F

estructura y propiedades de la, 57F, 66F, 172
ionización de la, 62-63F
nomenclatura, 53
requerimiento energético para la síntesis, 534T
síntesis de la, 528, 529F
β-alanina, 579-580F
alanina racemasa, 132F
alanina transaminasa, 131F
alantoato, 577-578F
alantoicasa, 577-578F
alantoína, 577-578F
alantoinasa, 577-578F
alcalosis, 41
alcaptonuria, 548
alcohol deshidrogenasa, 94-95F, 199, 342F
alcohol(es)
fórmula general del, 5F
reacción con aldehído, 227F
solubilidad en agua, 31T
alcoholes de azúcares, 232-233F
aldehído, 227F
fórmula general del, 5F
aldohexosas, 224F
aldolasa (fructuosa-1, 6-*bi*fosfato aldolasa)
en el ciclo RPP, 466F
en glicólisis, 330F, 334-335F
en la síntesis de la sacarosa, 472F
aldopentosas, 224F
aldosa reductasa, 366
aldosas, 223-225F
ciclización de, 226-229F
estructuras de, 224F
aldotetrosas, 224F
alimentación, metabolismo de carbohidratos durante la, 379-381F
almidón, 8
degradación de, 237-239F
digestión del, 306
estructura del, 237T
síntesis de, 471-473F
aloisoleucina, 58F
alolactosa, 666, 667F, 668
alopurinol, 576F
alosa, estructura de la, 224F
alotreonina, 59
1-alquil-2-acilglicerol, 491F
1-alquil-2-acilglicerol-3-fosfato, 490, 491F
1-alquil-2-acilglicerol-3-fosfocolina, 491F
1-alquilglicero-3-fosfato, 490, 491F
1-alquilglicerofosfato aciltransferasa, 491F
1-alquildihidroxiacetona, 490
1-alquildihidroxiacetona fosfato oxidorreductasa, 491F
1-alquildihidroxiacetona fosfato sintasa, 491F
altrosa, 224F
amida, fórmula general de la, 5F
amilasas
α-amilasa, 238, 239F, 240
β-amilasa, 140T, 239F, 240
amilo-1, 6-glicosidasa, 374, 375F
amilopectina, 237, 238-239F
estructura de, 237T, 238F
amilosa, estructura de, 237T, 238F
amina primaria, 5F
amina secundaria, 5F
amina terciaria, fórmula general de la, 5F
aminas, fórmula general de, 5F
α-aminoadipato, γ-semialdehído, 549F
γ-aminobutirato (GABA), 61F, 536
β-aminoisobutirato, 579-580F
amino tautómeros, de adenina y citosina, 586F
amino-α terminal, 164T
aminoácido feniltiocarbamoíl (aminoácido PTC), 73F
aminoácido(s), 52-83
catabolismo de, 539-540F
codones para, 683-686
como precursores gluconeogénesis, 360, 362, 363, 365
composición en proteínas, 72T-73F
común
cadenas laterales con grupos alcohol, 59F
estructuras de los, 55F-61T
grupos R ácidos y sus amidas, 60F
grupos R alifáticos, 57-58F
grupos R aromáticos, 58F
grupos R básicos, 59-60F-61T
grupos R con contenido sulfurado, 58-59F
hidrofobicidad de las cadenas laterales de aminoácidos, 60-61T
derivados de, 61-62F
en la síntesis del aminoacil-ARNt, 688-691F
en reacciones de transaminación, 524-525F
en sitios activos de enzimas, 147-148F
enlace peptídico, 66-67F
esenciales 520
estructura de
cadenas laterales, 55F-61T
general, 6F, 53-55F
ionización de los, 62F-66T
no esenciales, 520
nomenclatura alternativa, 53
y reacciones dependientes de PLP, 542
y regulación de la gluconeogénesis, 365
α-aminoácidos, 53, 204-207F
en el ciclo de la glucosa-alanina, 553F
aminoácidos aromáticos, 546-548F
aminoácidos cetogénicos, 544
aminoácidos de cadena ramificada, 58
degradación de, 543-545F
síntesis de, 528
aminoácidos esenciales, 520. *Ver también* aminoácidos
aminoácidos glicogénicos, 541
aminoácidos no esenciales, 520. *Ver también* aminoácidos
aminoacilación, 688-689
aminoacil-adenilato, 690F
aminoacil-ARNt, 690F
acoplamiento en sitio A, 699-700F
nomenclatura de, 689
síntesis de, 689-690F
sitios de unión en ribosomas, 695F
y elongación de la cadena peptídica, 698-699
aminoacil-ARNt sintetasas, 688-692F
aminoacil-ARNt sintetasas clase I, 691
aminoacil-ARNt sintetasas clase II, 691
actividad correctora, 691-692F
especificidad de, 689-691F
síntesis de, 689F
α-aminoadipato, 548
aminoazúcares, 231
abreviaturas, 231T
estructuras de, varios 232F
2-amino-3-cetobutirato, 543F
2-amino-3-cetobutirato liasa, 543F
aminoimidazol carboxamida ribonucleótido (AICAR), 535-536F, 560F
aminoimidazol ribonucleótido (AIR), 560F, 561F
aminoimidazol succinilocarboxamida ribonucleótido (SAICAR), 560F
2-amino-6-oxopurina. *Ver* guanina
6-aminopurina. *Ver* adenina
aminotransferasas, 524. *Ver* transaminasas
amoniaco, 27F, 578
asimilación del, 523-525F
conversión del nitrogéno en, 521-522F
conversión en urea en el ciclo de la urea, 549-553F
en el ciclo del nitrógeno, 521F
metabolismo a partir de la degradación de aminoácidos, 549
pH, 41F
síntesis de la glutamina y, 523-524F
amortiguador, 46-49
AMP (adenosina 5'-monofosfato, adenilato)
a partir de cAMP, 287
a partir de hidrólisis del ATP, 310F
activación del glucógeno fosforilasa por, 373
en el catabolismo de la purina, 574-575
energía libre estándar de hidrólisis para, 315T
interconversión de, 574F
nomenclatura, 588
síntesis de, 561-563F
y regulación de la glicólisis, 347-348F
y regulación de la gluconeogénesis, 365F
y regulación de la síntesis de nucleótidos de purina, 562-563F
y regulación del metabolismo del glucógeno, 374
AMP deaminasa, 575
AMP-ADN-ligasa intermedia, 627F
ampicilina, 723F, 727
amplificación, 285
amp^R, 726F, 727
análisis de aminoácidos, 72
ánalogos de estado de transición, 176-177F
análogos de sustrato, 145
ancestro común, 684
Anfinsen, Christian B., 108-109
ϕ (ángulo de rotación), 91F
en hélice alfa, 93, 95
en láminas β, 97
en residuos por giro, 98
ϕ (ángulo de rotación), 91F
en hélice ψ, 93, 95
en hojas ψ, 96
en residuos por giro, 98
anhidrasa carbónica, 193F
constante de velocidad, 140T
en la conversión del dióxido de carbono α bicarbonato, 193F
número de recambio de, 138T
velocidad aparente de segundo orden, constante para, 167T
anión, 44
anión superóxido, 138, 440
anómeros, 227
anotación, 728
antiadenosina, estructura de, 588F
antibióticos, 707
anticodón, 686F, 687F
ARNt, 688
posición de tambaleo, 688T
anticonformación, 588F
anticuerpos (inmunoglobulinas), 53
catalíticos, 178F
estructura y función de los, 123-124F
anticuerpos catalíticos, 178F
antígeno nuclear de proliferación (PCNA), 621F, 631
antígenos, 123-124F
antiporte, 281F
antranilato, 534
estructura del, 534F
*Apa*1, 609T

aparato de Golgi, 19F, 20F
síntesis de lípidos en, 506
transporte de proteínas en, 713F, 714F, 716
apareamiento de bases de Watson-Crick, 686F, 688
apareamiento de iones, 34
AP-endonucleasa, 637, 642
ApoB-100, 512
ApoB-48, 512
apoenzimas, 192
apolipoproteínas, 511-512F
apoptosis, 538
Ara (arabinosa), estructura de, 224F
arabinosa-proteína enlazante, 103F
araquidonato, 256
fórmula molecular del, 255T
síntesis de eicosanoides y, 488-490F
araquidoníl-CoA, 484-485F
árbol filogenético, 80F
Arg-171, 200F
arginasa
en el catabolismo de la arginina, 541
en el ciclo de la urea, 549-550, 552F
arginina, 52F, 59, 145F
degradación de la, 541F
en el ciclo de la urea, 549-552F
función catalítica de la, 163T
requerimiento energético para la síntesis, 534T
síntesis de, 528, 530F
síntesis del óxido nítrico y, 537F
arginina cinasa, 183F
argininosuccinato, 550, 552F
argininosuccinato sintetasa, 550, 552F
argininosuccinatoliasa, 550, 552F
Aricept (clorhidrato de donepecilo), 129F
ARN (ácido ribonucleico), 3, 10. *Ver también* ARNm; ARNr; ARNt; procesamiento del ARN; transcripción
contenido en célula, 599, 648, 649T
descubrimiento de, 583
fragmentos de Okazaki y, 624F
hidrólisis alcalina de, 493F, 495
hidrólisis de
alcalina, 605-606F
por nucleasas, 605-610F
ribonucleasa-catalizada, 605-607F
hidrólisis por ribonucleasa-catalizada de, 605-607F
horquilla en, 658F
modificación de las terminales de ARNm, 674-676F
modificación postranscripcional de, 670-673F
síntesis de. *Ver* transcripción
tipos de, 599, 648
y cribado de las bibliotecas de ADN, 731-732F
y modificación covalente de nucleótidos, 674
ARN de transferencia. *Ver* ARNt
ARN mensajero (ARNm), 10, 599, 648, 683
codones, 688F
construcción de una biblioteca de cADN y, 729-730F
contenido en célula, 648, 649T
estabilidad de, 648
marco de lectura del, 685F
procesamiento de, 674-680F
precursor de, 660T
ARN mensajero. *Ver* ARNm
ARN nuclear heterogéneo (hnARN), 660
ARN polimerasa I, 693
ARN polimerasa
bloqueo de transcripción del operón *lac* y, 666
como proteína oligomérica, 649-650
conformación cambiante de, 655-656
estructura de, 650F
eucariota, 660T
reacción de elongación de cadena y, 650-652F
regulación del operón *trp* y, 709-710F
subunidades de, 649-650T
ARN ribosomal. *Ver* ARNr
ARNasa A, clivaje de ARN por, 607F
ARNm policistrónico, 697
ARNr (ARN ribosomal), 10, 599. *Ver también* ribosomas; ARN
contenido en célula, 648, 649T
procesamiento de, 672-673F
y estructura de ribosomas, 693-694F
ARNt (ARN de transferencia), 684, 686F-688T. *Ver también* síntesis de proteínas; ARN
aminoacil-ARNt sintetasas, 688-692F
anticodones de, 688
ARNt isoaceptor, 688, 689
contenido en célula, 599, 648, 649T
descubrimiento de, 649
en elongación de cadena peptídica, 699-700F
estabilidad de, 687-688
estructura de, 686-688F
extremo CCA de, 689
función de, 599
procesamiento de, 672F
rTNA iniciador, 695
síntesis de proteínas y, 688
sitios de unión en ribosomas, 695F
y aminoacilación, 688-689F
y modificación covalente de nucleótidos, 674
y tambaleo, 688
ARNt iniciador aminoacilatado (fMet-ARNt_i^{Met}), 697
ARNt^{Ala} 688
ARNt^{Fe}, 687F, 688, 700F
ARNt^{Gln}, 689
ARNt^{Ile}, 692F
ARNt^{Ser}, 689
arqueobacteria, 18
arsenito, 340
1-arseno-3-fosfoglicerato, 340
asas y giros, 97-98F
dominios y, 100
ascenso, 594
ascenso de la hélice ADN, 594
Asp-102, 184-187F
asparagina
cadenas laterales, 94
catabolismo de la, 541
estructura de la, 60F
hidrólisis de la, 541
oligosacárido unido a la, 716F
requerimiento energético para la síntesis de la, 534T
síntesis de la, 526-527F
asparaginasa, 526, 540, 541
aspartame, 67F
aspartato
balanceo del suministro de nitrógeno ciclo de la urea, 553F
catabolismo del, 525
como precursor gluconeogénico, 363
degradación del, 541
en el catabolismo de la purina, 578F
en el ciclo de la urea, 549-550, 551F, 552F, 553F
en la reacción de aspartato transaminasa, 526
en la ruta del C_4, 475F
en la síntesis de aminoácidos, 526-527F
en la síntesis de la asparagina, 526
en la síntesis de nucléotidos de purina, 559-560F
en lanzadera del malato-aspartato, 438F
en reacciones transaminasa, 525F
estructura de, 60F
función catalítica del, 163T
requerimiento energético para la síntesis del, 534T
síntesis del, 526-527F
aspartato aminotransferasa, 524
aspartato transaminasa
en el ciclo de la urea, 551, 553F
en la ruta quitar C_4, 475F
en lanzadera de malato-aspartato, 438F
aspartato transaminasa citosólica, 438F
aspartato transaminasa mitocondrial, 438F
aspartato transcarbamoilasa (ATCasa), 149, 566-567F
aspartato β-semialdehído, 527-528F
β-aspartil de fosfato, 527F
aspirina (ácido acetilsalicílico), 267
búsqueda de un sustituto, 490
efecto sobre prostaglandinas, 489
ataque nucleofílico, 159
ATCasa (aspartato transcarbamoilasa), 149, 566, 567F
aterosclerosis, 513
ATP (adenosina trifosfato)
a partir de fosforilación oxidativa, 415, 416, 418-421F, 432-435F, 435-436, 436-437
a partir de la degradación de glucógeno, 373, 374
a partir de la fosforilación a nivel sustrato, 337
a partir de la glicólisis, 343
a partir de la oxidación de ácidos grasos, 498, 500
aminoacil-ARNt sintetasa y, 689-691F
ARN polimerasa y, 651
coenzimas metabólicas derivadas a partir de, 194T, 196F
coenzimas reducidas y producción de, 403T-404F
como una coenzima, 193, 194, 195T, 196F
en el metabolismo de nucleótidos, 574F
en la ruta de señalización adenilil ciclasa, 287
en la síntesis de histidina, 535-536F
en la síntesis del dUMP, 570-571
en síntesis de acetil-CoA, 316-317
energía libre del, 310F-313T
estructura de, 9F, 558F
fosfofructocinasa-1 y, 347-348F
funciones metabólicas de, 313F-317T
producción de ATP mediante transferencia del grupo fosforilo, 315-316F
transferencia del grupo fosforilo, 314F-315T
transferencia del grupo nucleotidilo, 316-317F
generación a partir de la β-oxidación de, 503
hidrólisis del, 310F-313T
inhibición del glucógeno fosforilasa por, 374
producción en ciclo del ácido cítrico, 392F 405F
producción vía glucólisis, 351
regulación alostérica de la ribonucleótido reductasa, 570T
regulación del ciclo del ácido cítrico y, 405
requerimientos de la gluconeogénesis, 358-359F
síntesis de, 20
síntesis de PRPP y, 558-559F
succinil-CoA y, 399-400

transporte a través de la membrana mitocondrial interna, 435F
transporte activo y, 282-283F
uso quitar en síntesis de proteínas, 705
y ciclo de la urea, 549, 550F, 552F
y regulación de la glicólisis, 347-348
y regulación del metabolismo del glucógeno, 374
ATP sintasa, 432-435F
cloroplasto, 463F
en fosforilación oxidativa, 416, 418
estructura de, 433F
F_0F_1 ATP sintasa, 432
ATPasas tipo F, 432
atrofia girada, 548
autoensamble asistido, de proteínas, 115
Avery, Oswald, 3, 583
avidina, 208
ayuno
exceso de acetil-CoA y, 513
gluconeogénesis y, 358, 360, 363
regulación de oxidación de ácidos grasos y, 508
azúcares ácidos, 233F
abreviaturas, 231T
azúcares no reductores, 236
azúcares reductores, 236
azufre, 3
radio de van der Waals, 35T
β dominios, 101
β emparedado (sándwich), 97F, 100, 102F, 111
β-estradiol, 496, 498F
β-galactosidasa, 665, 666-667F
β-galactosidasina, 728
β-globina, 117-118F
β-glucosidasas, 240
β hélice, 102F
β-hidroxibutirato deshidrogenasa, 514-515F
β-hidroxibutirato, 513-514F, 515
β-isopropilato deshidrogenasa, 727
bacteria púrpura, 445F
bacteria. *Ver también* procariotas
ADN en, 3
como húespedes de restricción, 608
fijadora de nitrógeno, 522
reproducción de, 16
Bacteriocloroflas, 445F
bacteriófago T3, 660
bacteriófago T4, 17
bacteriófago γ
digestión de, 611F
mapa de restricción de, 611F
y construcción de una biblioteca de ADNc, 729
y empaques de vectores cósmidos, 724, 725F
y endonucleasas de restricción, 611F
bacteriófagos, 16-17
bacteriorrodopsina, 276F
transporte activo y, 282
bactoprenol (alcohol undecaprenílico), 267F
B-ADN, 590, 593-594F, 595F. *Ver también* ADN
*Bam*HI, 609T
Banco de Datos de Proteínas (PDB), 88, 129F
bancos de ADN. *Ver* bibliotecas de ADN
banda de Soret, 216, 218F
banda γ, 216, 218F
barrera de activación, 161F
barril β, 102F
base conjugada, 41-42
base de Schiff, 116F, 147F, 205F
base débil, 41
base fuerte, 41
base(s), 38, 41-42
conjugada, 41-42
débil, 41
fuerte, 41
bases, purina y pirimidina
composición de base de ADN, 590T
en nucleósidos y nucleótidos, 584
estructuras de, 585F
nomenclatura, 589T
tautómeros, 586F
Beadle, George, 647
benzamidina, 145F
beriberi, 194T, 202
bibliotecas de ADN, 728-732
ADNc, 729-730F
genómico, 728-729
seleccionar, 731-732F
bibliotecas de ADNc, 729-730F
bicapa, lípido. *Ver* bicapas lipídicas
bicapas lipídicas, 269-270F
difusión dentro, 271-273F
hojillas de, 273, 274F, 275F
transición de fase de, 273, 274F
bicarbonato, 207F
en CAM, 475F
en el ciclo de la urea, 549, 550F
en el metabolismo de nucleótidos de pirimidina, 563, 565
en la conversión del propionil-CoA a succinil-CoA, 544
en la ruta C_4, 475F
producción de, vía metabolismo de la glutamina renal, 553-54F
valores K_a y pK_a de, 43T
y sistema amortiguador de la sangre, 48
1, 3-*bi*fosfoglicerato
en glicólisis, 336-338F, 340F, 342F
en gluconeogénesis, 359F
energía libre estándar de hidrólisis para, 315T
estructura de, 331F
2, 3-*bi*fosfoglicerato (2, 3BPG)
efecto sobre la hemoglobina, 121-122F
en el mecanismo de la reacción fosfoglicerato mutasa, 338
en glóbulos rojos, 338F
2, 3-*bi*fosfoglicerato fosfatasa, 338F
*bi*fosfoglicerato mutasa, 338F
biocitina, 207F
bioenergética, 12F. *Ver también* ATP; metabolismo; termodinámica
bioinformática, 3
biología molecular, 3
bioquímica, 1-24
biopolímeros, 7, 12
células, 16-24
como unidad básica de la vida, 16-17
E. coli, 17F
eucariótica, 16, 18-22F
procariótica, 16, 17-18F
como ciencia del siglo XX, 2-3
definición, 1
elementos químicos de la vida, 3-5
energética, 11-15F
evolución y, 15-16
naturaleza multidisciplinaria de, 24
terminología especial de, 24-25T
biosíntesis del triptófano, 534
biotina carboxilasa, 481
biotina (vitamina H), 194T, 195T, 207-208F
bolsillo de especificidad, 183, 186F
bolsillo de unión pirimidina, 606, 607F
Boyer, Herbert, 721
Boyer, Paul, 433
brazo anticodón, 686F, 687F
brazo D, de ARNt, 686F, 687F
brazo TψC, 686F, 687F
brazo variable, de ARNt, 686F, 687F
brazos l, 724, 725F
Briggs, George E., 136
5-bromo-4-cloro-3-indolil-, β-D-galactosidasa (X-gal), 728F
bromoxinil, 737
bromuro de cianógeno, 76F
Bruice, Thomas, 172
Buchanan, John M., 558
Buchner, Eduard, 2, 329
butanol, 31T
Ca^{2+} ATPasa, 282
cabeza hidrofílica (polar), 10, 11F
cabeza polar (hidrofílica), 11F
cadena de transporte de electrones
aniones superóxido, 440
citocromo P450, 537
cofactores en, 424
hidrogenasa y fumarato reductasa, 339-340F
y fosforilación oxidativa, 418-419, 421F, 437-439
en mitocondrias, 416-418F
y lanzaderas mitocondriales, 436-438F
y teoría quimiosmótica, 422F
cadena de transporte electrónico en la respiración. *Ver* cadena de electrotransporte
cadena-α de la hemoglobina, composición de aminoácidos, 72T
cadenas de acilo, fluidez de la bicapa lipídica y, 273-274
cadenas de oligosacáridos complejos, 247-248F
cadenas laterales (grupos R), 57F
acídicas, y sus derivados amida, 60F
alifáticas, 57-58F
aromáticas, 58F
básicas, 59-60F
con contenido de azufre, 59F
conformación y, 55
en hélice α, 94
estados iónicos de, 62F-66T
hidrofobicidad de, 60-61
cafeína, 288F
Cahill, George, 379
CAIR (carboxiaminoimidazol ribosil-5-fosfato), 560F, 561F
caja TATA, 654, 661F, 662F
calcio, 3
activación de la fosforilasa quinasa por, 376
en la ruta de señalización del inositol-fosfolípido, 289
regulación del ciclo del ácido cítrico y, 406
calentamiento, desnaturalización de proteínas y, 107-108F
calmodulina, 376
calor de vaporización, 30
calor específico, del agua, 29
Calvin, Melvin, 465
CAM (metabolismo del ácido de las crasuláceos), 474-476F
cambio de entalpía, 13
cambio de entropía, 13
cambio en la energía libre (G), 13, 308-310
constantes de equilibrio y, 309-310
definición de, 308
en glicólisis, 343-344F
espontaneidad de reacciones y, 309
fuerza protonmotriz y, 421
potencial de reducción y, 319F-321T
real frente a estándar, 308
relación entre real, estándar y K_{eq}, 308-309
cambio estándar de energía libre, 423. *Ver también* cambio de energía libre
contra cambio real de energía libre, 308

relación con el potencial de reducción estándar, 423
y constante de equilibrio, 308
caminata aleatoria de difusión, 22
cAMP (3', 5'-monofosfato cíclico de adenosina), 375
activación de la proteína reguladora, 668-670F
producción de, 669-670F
producción e inactivación de, 287F
y CRP, 669-670F
y regulación de la glucogenólisis, 376
y regulación del metabolismo del glucógeno, 376
y ruta de señalización de la adenilil ciclasa, 287F
cAMP fosfodiesterasa
en la hidrólisis de cAMP, 287
inhibición de, 287
y regulación del metabolismo del glucógeno, 376
canales, 280F
canales de potasio, 280
canalización de metabolitos, 154, 527
cáncer, tratamiento del, 741
caotropos
efecto en la solubilidad de compuestos no polares, 33
y desnaturalización de proteínas, 108
cap (casquete), 674-675F
CAP (proteína activadora de catabolitos), 669
capacidad de amortiguación, 46
capsaicina, 284
carbamato, 550F
carbamoíl aspartato, 564-566F
carbamoíl fosfato
en el ciclo de la urea, 549-552F
en la síntesis del nucleótido de pirimidina, 564-568F
inhibición de la glutamina sintetasa por, 565
síntesis de, 549, 550F
carbamoíl fosfato sintetasa, 549, 550F, 565-567F
4a-carbinolamina, 546-547F
4a-carbinolamina deshidratasa, 546-547F
carbocatión (ion carbonio), 160
carbohidratos (sacáridos), 222-249. *Ver también* monosacáridos; oligosacáridos; polisacáridos; *rutas específicas del metabolismo de carbohidratos*
clasificación de, 223-225
como cadenas de moléculas, 247
derivados de, 241-248F
descripción general de, 222-225
disacáridos, 222, 234-236F
funciones de, 222
glicoconjugados, 222, 241-249F
glicoproteínas, 244-249F
peptidoglucanos, 243-244F
proteoglucanos, 241-243F
glicósidos, 236F
disacáridos, 223, 234-236F
polisacáridos, 222, 237T-241F
nomenclatura de, 223
solubilidad de, 31
y digestión, 240
carbonilo, fórmula general del, 5F
carbono, 3-4
radio de van der Waals, 35T
carbono anomérico, 227
carboxi fosfato, 550F
carboxiaminoimidazol ribonucleótido (CAIR), 560F, 561F,
2-carboxiarabinitol 1-fosfato, 469F
carboxibiotina, 207F, 481
carboxilato, 178F
fórmula general del, 5F
α-carboxilo
en enlaces peptídicos, 66F, 67
ionización del, 62, 63-64
carboxilo de cadena lateral, 164T
carboxilo-α terminal, 164T
carboxipeptidasa, 130, 138T
6-carboxiuracilo. *Ver* orotato
Cardiolipina (difosfatidilglicerol), 260F
carga, en la síntesis de ácidos grasos, 483
carnitina, 501, 503F
carnitina: acilcarnitina traslocasa, 501
carnitina aciltransferasa I (CAT I), 501, 503F
regulación de ácidos grasos y, 507
carnitina aciltransferasa II (CAT II), 501, 503F
β-caroteno, 213F
estructura del, 448F
carotenoides, 447
cartílago, 241-242F
cascada, 285
cascada de señalización, 303F
caspasas, 538
catabolismo de la pirimidina, 579-580F
catabolismo de la purina, 574-578F
en músculo, 578F
catalasa
en el catabolismo del peróxido de hidrógeno, 440
grupo hemo de, 193
número de recambio de, 138T
velocidad aparente de segundo orden, constante para, 167T
catálisis
ácido-base, 164-165F, 185
covalente, 165-166F, 185, 186F
efecto del pH en las velocidades de la, 166-167F
límite superior para, 167F-171T
modos enlazantes de, 171-178F
participación de los residuos de aminoácidos en sitio activo en, 164T
por anticuerpos, 178F
por ARN, 130
y análogos del estado de transición, 178
y cofactores, 192
y el efecto de proximidad, 172
y estabilización del estado de transición, 160-162F
catálisis ácido-base, 164-165F, 185
por triosa fosfato isomerasa, 168F
serina proteasas y, 185
catálisis covalente, 165-166F, 185, 186F
catálisis de ácido específico, 164
catálisis de anticuerpos, 178F
catálisis de base específica, 164
catálisis general ácido-base, 164
serina proteasas y, 185
catalizador
ciclo del ácido cítrico como, 393
definición, 129
primeras investigaciones sobre, 2
CBP (proteína de unión al casquete), 697
CDP (citidina difosfato), 196
CDP-colina, 486F
CDP-etanolamina, 486F
celda electroquímica, 319F
celobiosa (β-D-glucopiranosil-(1-4)-D-glucosa), 235F
célula ancestro común, 16
células
elementos traza en, 4F
material sólido de, 4
células anfitrionas, con contenido de ADN recombinante, 727-728
células eucarióticas, 16, 18-22F
citoesqueleto, 18, 19F, 22F
difusión de moléculas grandes en, 22-23
mitocondria y cloroplastos, 20-21F
núcleo de, 18-19F
otros organelos, 21-22
procesos metabólicos en, 307F
retículo endoplásmico y aparato de Golgi, 19F, 20F
transporte de membrana en, 712-716F
células sanguíneas
formación del 2, 3-*bi*fofoglicerato en, 338F
glicólisis y, 341F
y hemoglobina, 117F
células, 16-24F
ancestro, 16
como unidad básica de la vida, 16-17
componentes macromoleculares de, 26
E. coli, 17F
eucarióticas, 16, 18-22F
citoesqueleto, 18, 19F, 22
difusión de moléculas grandes en, 22-23
mitocondria y cloroplastos, 20-21F
núcleo de, 18-19F
otros organelos, 21-22
retículo endoplásmico y aparato de Golgi, 19-20F
procarióticas, 16, 17-18F
celulosa, 18, 239-241F
estructura de, 8F, 237T, 240F
y digestión, 240
centrifugación, 67
centro de reacción, 449
centro de reacción fotosintética, 106F
centro reactivo, 193
centros quirales, 54
ceramidas
en esfingolípidos, 262
en la ruta de señalización de fosfolípidos de inositol, 290
en la síntesis de lípidos, 492F, 494
en organización lípida, 254F
estructura de, 262F
ceras, 10, 254F, 266F
cerebrósidos
descripción de, 263
en la organización de lípidos, 254F
síntesis de, 492F, 494
cetoacidosis diabética, 516
cetoacil-ACP, 483F
3-cetoacil-CoA, 482-83F, 499-500F
α-cetoadipato, 547, 548F
α-cetobutirato, 528, 531, 543, 545
3-cetoesfinganina, 492F, 494
3-cetoesfinganina reductasa, 492F
cetogénesis, 515
α-cetoglutarato, 131, 524-525F, 528, 554
cetohexosas, 225, 226F
α-cetoisovalerato, 528-529F
α-ceto-β-metilvalerato, 528-529F
cetona, fórmula general de, 5F
complejo α-cetoglutarato deshidrogenasa en ciclo del ácido cítrico, 399
cuerpos cetónicos, 513-516F
diabetes y, 516
en catabolismo de aminoácidos, 539-540F, 544F, 546F, 547, 548
en ciclo del ácido cítrico, 398-399
en ciclo glioxilato, 408F
en ciclo de la urea, 549F, 550, 552F, 553F
en lanzadera de malato-aspartato, 438F

en reacciones por transaminasas, 525F
en síntesis de aminoácidos, 528, 529
en síntesis de proteínas, 406
estructuras de, 515F
oxidación de, 515F
oxidación en mitocondria, 515F
síntesis de, 513F-514
y ácido lipoico, 212
y regulación del ciclo del ácido cítrico, 405
cetopentosas, 225, 226F
cetosas, 223-226F
ciclación de, 226-229F
cetotetrosa, 225, 226F
cetotriosa, 226F
CF_0CF_1 ATP sintasa. *Ver* ATP sintasa
cGMP (3', 5'-monofosfato cíclico de guanosina)
en ruta de señalización del adenilil ciclasa, 287
Chance, Britton, 418
chaperonas
y plegamiento de proteínas, 112-115F, 704
y transporte de proteínas, 716
chaperones moleculares, 112-115F
chaperonina, 113
Chargaff, Erwin, 590, 593
clorofila *b*, estrucutra de, 445F
cianato de amonio, 2
cianobacteria, 15-16, 21, 445F
ciclo de Calvin. *Ver* ciclo reductivo de la pentosa fosfato
ciclo de Cori, 362-363F
ciclo de Krebs. *Ver* ciclo del ácido cítrico
ciclo de la urea, 2, 549-553F
descripción de, 549F
frente a síntesis de núcleótidos de purina, 559
reacción de, 549-550F
auxiliar, 550-553F
relación con la gluconeogénesis, 363
suministro equilibrante de sustratos para, 553F
ciclo de nucléotido de purina, 578F
ciclo de reducción del carbono fotosintético. *Ver* ciclo reductivo de la pentosa fosfato
ciclo de reducción fotosintética, 470
ciclo de sustrato, 364-365F
ciclo del ácido cítrico, 299F, 305F, 306, 384-414
acetil-CoA y, 306, 498
hidroxibutirato y, 515-516
oxidación del acetil-CoA por, 391T-393F
producción de intermediarios vía catabolismo de amioácidos, 550F
producción de moléculas ricas en energía mediante, 403-404F
reacciones del, 391T-402F
regulación del, 404-406F
relación con otras rutas metabólicas, 327, 328F, 365, 407-410F, 498, 500, 549
síntesis de los aminoácidos y, 526F
tioésteres y, 318
y el ciclo del glioxilato, 407-410F
y metabolismo del piruvato, 385-391F
ciclo del ácido *tri*carboxílico. *Ver* ciclo del ácido cítrico
ciclo del glioxilato, 362, 407-410F, 498
ciclo del nitrógeno, 521-523F
ciclo fotosintético Q, 455-456F
ciclo fútil. *Ver* ciclo del sustrato
ciclo glucosa-alanina, 363, 552-553F
ciclo Q
en transporte de electrones, 427, 429
fotosintético, 455-456F
ciclo reductivo de la pentosa fosfato (RPP), 467F
ciclo RPP. *Ver* ciclo reductivo de la pentosa fosfato
ciclooxigenasa (COX), 488-489F
inhibición de la, 490
ciclosis, 488-489F
ciclosporina A, 90-91
cilio, 22, 85
cinasa de adenililo, 103F
cinasas (fosfotransferasas)
número de recambio para, 138T
y clasificación de enzimas, 131
cinética
de reacciones de sustrato, 141-142F
de transporte pasivo, 281F
enzimática, 134-135F
química, 133-134F
cinética de ping-pong
catálisis covalente de, 166
de nucleósido difosfato cinasa, 561
descripción de, 142F
serina proteasas y, 184-185
cinética enzimática, 23, 134-135F
cinética química, 133-134
cinética sigmoidal, 151
cistationina, 531F, 545F
cistationina, β-sintasa, 531F
cistationina γ-liasa, 531F
cisteína (mercaptoalanina, tioserina)
biosíntesis de, 531F
conversión a piruvato, 546F
en el catabolismo de la metionina, 545F
función catalítica de, 163T
requerimiento energético para la síntesis, 534T
y formación de enlaces disulfuro, 59F
cisteinasulfinato, 546F
cistina, 62
formación de, 59F
cistinuria, 548
citidilato. *Ver* CMP
citidina, 587, 588F
citidina 5'-monofosfato (CMP), 579
citidina desaminasa, 579
citidina difosfato colina (CDP-colina), 486F
citidina trifosfato. *Ver* CTP
citocromo *a*
absorción máxima, 217T
en transporte de electrones, 424
grupo hemo, 217F
potencial de reducción estándar de, 423T
citocromo a_3, 424
citocromo *b*
absorción máxima, 217T
en transporte de electrones, 426, 427, 429F
grupo hemo, 217F
citocromo b_{562}, 102F
citocromo *c* oxidasa, 429-431F
características, 423T
en la síntesis del óxido nítrico, 537
energía libre estándar, 423T
potenciales de reducción estándar, 423T
citocromo *c*
árbol filogenético, 80F
composición de aminoácidos, 72T
conservación evolutiva de la estructura proteínica y, 100F
en transporte de electrones, 422F, 424, 427
espectro de absoción/máxima, 217T, 218F
estructura de, 217F
grupo hemo, 217F
potencial de reducción estándar de, 423T
secuencias de, 78-79F
citocromo c_1
en transporte de electrones, 424, 427, 429F
potencial de reducción estándar de, 423T
citocromos, 216-218F
en transporte de electrones, 421, 424, 431F
espectro de absorción de, 217T, 218F
grupo hemo, 217F
potencial de reducción de, 423T
citoesqueleto, 18, 22
citoplasma, 18
organización de, 22
citosina (2-oxo-4-aminopirimidina), 585-586
desaminación de, 637-639F
en puentes de hidrógeno, 35F
estructura de, 563F, 585F
tautómeros, 586F
citosina arabinósido (1-β-D-arabinofuranosilcitosina),
citosina (C), 9
citosol, 17F, 18, 19F
ciclo del glioxilato y, 409
de *E. coli*, 23F
organización del, 22-24
reacciones del ciclo de la urea en, 549, 550, 552F
síntesis de ácidos grasos en, 480
citrato
conversión por isocitrato deshidrogenasa, 396
en el ciclo del glioxilato, 408F
en síntesis de ácidos grasos, 406
regulación de la glicólisis y, 348
regulación de oxidación de ácidos grasos y, 508
citrato sintasa, 394-396F
en el ciclo del ácido cítrico, 405
en el ciclo del glioxilato, 408F
citrato sintasa glioxisomal, 409
citrulina, 61
en el ciclo de la urea, 550, 552F, 553F
síntesis del óxido nítrico y, 537F
Cleland, W. W, 142
clonación, 721. *Ver también* tecnología de ADN recombinante
cloranfenicol, 707
clorofila *a*, estructura de, 445F
clorofila *a/b,* complejo recolector de luz (LHC), 463
clorofilas, 445-449F. *Ver también* pigmentos fotosintéticos,
espectro de absorción de, 446F
estructuras de, 445F
glicina como precursor de, 537F
isopentil pirofosfato como precursor de la cadena lateral del fitol, 496
cloroformo, 268
cloroplastos, 20, 21F
ARN polimerasa en, 659-660
ATP sintasa, 459, 462, 463F
biosíntesis del almidón en, 472, 473
descripción de, 20-21F, 460-463F
origen endosimbiótico de, 21
cloruro, 3
cloruro de guanidinio, 108F
cloruro de sodio, 30F
interacciones carga-carga en, 33
CMP (citidina 5'-monofosfato, citidilato), 579
CMP-ácido-*N*-acetilneuramínico, 494
CoA. *Ver* coenzima A
cobalamina (vitamina B_{12}), 88F, 194T, 195T, 210-211F
adenosilcobalamina y metilcobalamina a partir de, 210
estructura de, 210F
glicina como precursor de, 537F
y anemia perniciosa, 211

cobre
en cadena de transporte de electrones, 424, 431F, 440
en plastocianina, 456
potencial de reducción estándar de, 423T
cociente P/O, 436
código genético, 647-648
código genético degenerado, 685
código genético estándar, 684-685F. *Ver también* código genético
codón para metionina, 686
codones, 683-86. *Ver también* código genético, ARNm
codones de iniciación, 686
codones de parada. *Ver* codones de terminación
codones de terminación (codones de parada), 685F, 686
codones sinónimos, 685, 688
coenzima A (HS-CoA-CoA), 195T, 201-202F
coenzima Q. *Ver* ubiquinona
coenzimas, 192-221F
clasificación de las, 193F-195T
cobalamina, 210-211F
coenzima A, 201-202F
derivada de vitaminas, 194-195T
descripción general de, 192
en metabolismo de piruvatos, 388
FAD y FMN, 200-201F
fosfato de piridoxal, 203-207F
lipoamida, 212F
metabolito, 196, 197
NAD^+ y $NADP^+$, 197-200F
pirofosfato de tiamina, 202-203F
principales, y sus funciones, 195T
proteína, 215-216F
citocromos, 216F-218T
tetrahidrofolato, 208-210F
ubiquinona, 214-215F
coenzimas derivadas de vitaminas, 194-195T
coenzimas metabolitos, 196F
coenzimas reducidas, 306. *Ver también* NAD;
cofactor tetrahidrobiopterina, 547F
cofactores. *Ver también* coenzimas
biotina, 207-208F
descripción de, 192F
función en el transporte de electrones, 424
ion esencial, 192-193
Cohen, Stanley N., 721
cola hidrofóbica (no polar), 10, 11F
cola no polar (hidrofóbica), 10, 11F
cola poli A, 674
colágena, 53, 62, 85, 115-116F, 246-247F
colato de sodio, 265F
colecalciferol (vitamina D_3), 213F
colesterol
como precursor de otras moléculas, 264
derivados del, 509
descripción del, 10, 264
digestión del, 509-510
efectos sobre la fluidez de membrana, 273-274
en la alimentación, 264
en lipoproteínas, 510F-513T
en membranas, 270
en plasma, 512-513
estructura de, 265F
productos metabólicos del, 496
síntesis del, 495-498F
acetil-CoA α isopentil pirofosfato en, 495-496F
escualeno a colesterol, 496, 498F
isopentenil pirofosfate a escualeno en, 496, 497F
otros productos de, 496, 498F
transporte a los tejidos periféricos, 264, 512
colina, 261F
colipasa, 510
columna vertebral de azúcar fosfato, 594F
combustibles metabólicos, 306
compartimentación, 306-307
Complejo I (NADH deshidrogenasa, NADH-ubiquinona oxirreductasa), 424-425F
características, 423T
energía libre estándar, 423T
potenciales de reducción estándar, 423T
Complejo II (succinato-ubiquinona oxidorreductasa), 425-427F
características, 423T
energía libre estándar, 423T
potenciales de reducción estándar, 423T
Complejo III (ubiquinol-citocromo *c* oxidorreductasa), 427-429F, 437F
características, 423T
energía libre estándar, 423T
potenciales de reducción estándar, 423T
Complejo IV (citocromo *c* oxidasa), 429-432F
características, 423T
energía libre estándar, 423T
potenciales de reducción estándar, 423T
Complejo V. *Ver* ATP sintasa
complejo ATP sintasa, en mitocondrias, 417
complejo citocromo *bf*, 455-457F, 458-459F, 463-464F, 470
complejo de iniciación 70S, formación de, 697-698F
complejo enzima sustrato (ES), 134-135
complejo enzima-sustrato mediante enlaces no covalentes (ES), 162
complejo holoenzimático de ARN polimerasa II, 662F
complejo piruvato deshidrogenasa
en la conversión del piruvato en acetil-CoA, 386-390F
en mitocondria, 418
hígado y, 508
lipoamida y, 212
regulación del ciclo del ácido cítrico y, 405F
complejo polipeptídico, en replicación de ADN, 616
complejo productor de oxígeno, 456-457, 463
complejo succinato deshidrogenasa, 401F. *Ver también* succinato-ubiquinona oxidorreductasa
en ciclo del glioxilato, 408F
complejo g, de ADN polimerasa III, 618T, 619F, 628, 631
complejos de iniciación, 695-696
complejos de varias enzimas, 212
complejos del ácido a-ceto deshidrogenasa, 390
compuestos de poliprenilo. *Ver* isoprenoides
compuestos de reacción lenta de anafilaxis, 490
compuestos de tiol, 75
compuestos orgánicos, 5F
compuestos ricos en energía. *Ver* ATP; CTP; GTP; fosfoenolpiruvato (PEP), UTP
concanavalina A, 102F
concentración de sustrato, 365-366
condensación, 5, 37F
en la síntesis de ácidos grasos, 480, 481F
en la síntesis del colesterol, 495-497F
configuración D, carbohidratos y, 228
conformación, 84
ADN de doble hebra, 597F
ajuste inducido y, 174-175
cadenas laterales y, 55
cubierta, 8F
de ácidos nucleicos, 584
de ARN polimerasa, 655-656
de grupo peptídico, 90-92F
de hemoglobina, 122F
de monosacáridos, 229-231F
de nucleósidos y nucleótidos, 587
de proteínas, 7
de sitios catalíticos en ATP sintasa, 433-434F
histona, 602F
conformación *cis*, 90F
conformación desoxi, 121, 122F, 123
conformación en silla, 230-231F, 240F
conformación en sobre, 8F
de monosacáridos, 229, 230F
conformación nativa, 84
conformación oxi, 121, 122
conformación R
fosfofructocinasa-1, 150F
conformación *syn*, 588F
conformación T, fosfofructocinasa, 150
conformación T, hemoglobina, 121-122
conformación trans, 90F
conformaciones en bote, 230F
conformaciones giradas, 229, 230F
constante catalítica (K_{cat}, número de recambio), 138F, T, 139F, 140T
constante de disociación ácida (K_a), 41F-46T. *Ver también* pK_a
constante de equilibrio (K_{eq}), 13
cambios de energía libre estándar, 309
y cambio de energía libre, 309-310
constante de especificidad (k_{cat}/K_m), 139F-140T
constante de inhibición (K_i), 143
constante de Michaelis (K_m), 136-141F, 173, 174
medición de, 140-141F
significados de 138-139, 174
constante de transporte (K_{tr}), 281F
constantes cinéticas, 139F-140T
efectos de los inhibidores reversibles, 143T
cooperatividad
de plegamiento de proteínas, 110
de unión de sustrato, 152F
cooperatividad negativa, 153
cooperatividad positiva de unión, 120
Corey, Robert, 92, 95
corismato
función en la síntesis de tirosina y fenilalanina, 532-534F
corismato mutasa, 532F
corismato mutasa-prefenato deshidrogenasa, 533
síntesis de, 532F
corrección de pruebas
en replicación de ADN, 621-622
mediante aminoacilo-ARNt sintetasas, 691-692F
correpresores, 665
cósmidos, 724
cosustratos, 193
cotransporte, 281F
COX-1, 490
COX-2, 490
CPSF (factor de especificidad de ruptura y poliadenilación), 674, 676F
cremallera de leucina, 95F, 99
crestas, 417F, 418
cribado, genético, 727
Crick, Francis H. C., 3, 583-584, 590, 615, 647, 648, 683, 688
cristalografía de rayos X, 87-88F
cromatina, 85, 538, 599F-604T
fibras de 30 nm, 599, 601, 603F, 604
histonas en, 601-3F
nucleosomas en, 600-3F
organización de ”cuentas en collar”, 601F

cromatografía de afinidad, 69
cromatografía de capa delgada, 268F, 269
cromatografía de columna del ácido salicílico, 268-269F
cromatografía de intercambio iónico, 69
cromatografía en columna, 68-69F
cromatografía de gases, 268F, 269
cromosomas, 599-600
  de *Drosophila melanogaster*, 298
  nivel reducido de histonas, 604F
cromosomas artificiales bacterianos (BAC), 723
CRP (proteína reguladora de cAMP), 669-670F
C-terminal (carboxilo terminal), 66-67, 86
CTF (factor de transcripción NF1 de caja CCAAT), 661T
CTP (citidina trifosfato)
  ARN polimerasa y, 651
  como un compuesto rico en energía, 312
  en síntesis de nucléotidos de pirimidina, 567
  en síntesis de triacilglicerol, 487F
  síntesis de, 568F
CTP sintetasa, 568F
CTP: fosfatidato citidililtransferasa, 487F
CTP-diacilglicerol, 487F
curva de fusión, 596F
curva de saturación, sigmoidal, 151F
curvas de unión con el oxígeno, 119-121F
D. *Ver* dihidrouridilato
α-D-furanosa, 228
α-D-glucopiranosa, 227, 228F
α-D-glucopiranosil-(1-4)-D-glucosa (maltosa), 235F, 472
α-D-glucosamina (GlcN), 232F
α-D-ribofuranosa, 227, 229F
β-D-ribofuranosa. *Ver* ribosa
β-D-ribopiranosa, 227, 228F
β-D-ribopiranosa, 227, 228F
dactiloscopia de ADN, 612F
daltons, 6
dAMP (2′-desoxiadenosina 5′-monofosfato), 589F
Darwin, Charles, 15
dATP (desoxiadenosina trifosfato), 569, 570T, 632-633F
dCDP (2'-desoxicitidina 5'-monofosfato), 569
dCMP (2'-desoxicitidina 5'-monofosfato, desoxicitidilato), 588, 589F
dCMP desaminasa, 571
dCTP (desoxicitidina trifosfato), 632-633F
ddATP, 632-633F
ddNTP (2', 3'-didesoxinucleósido trifosfato), 632-633F
de aminoácidos de cadena ramificada transaminasa, 543, 544F
de la hidrólisis de ATP, 310F
  conversión en ATP, 20
  efectos sobre la fosfofructocinasa-1, 347-348F
  en coenzima A, 201-202F
  en el metabolismo de nucleótidos, 559-561F, 564-565F, 568-571T, 573-574, 578
  en fosforilación oxidativa, 419
  en la síntesis de ATP, 418-420F, 432-436F, 461, 463F
  fotorrespiración y, 469-470
  transporte a través de la membrana interna mitocondrial, 435F
  y la relación P/O, 436
  y regulación de la glicólisis, 347
  y regulación del ciclo del ácido cítrico, 405F
defectos enzimáticos, 323
degradación, 306
  de carbohidratos, 240
  de celulosa, 240
  de lípidos, 258
derivación del estado estable, de la ecuación de Michaelis-Menten, 136-138F
derivados de monosacáridos, 231-234F
desacetilación, 601
desacopladores, 419
desaminación hidrolítica, 636-637F
desaturación de ácidos grasos, 484-485
deshidrogenación, 160
deshidrogenasa del ácido a-cetoácido de cadena ramificada, 543, 544F
deshidrogenasas, 131
  NAD y NADP y, 198F, 199
  número de recambio de, 138T
desnaturalización
  de ADN, 596
  de proteínas, 107-110F
desnaturalización química, 108
desnaturalización térmica, 107F
5'-desoxiadenosilcobalamina. *Ver* adenosilcobalamina desoxiadenilato (dAMP), 589F
desoxiadenosina, 587, 588F
desoxiadenosina trifosfato (dATP), 569, 570T, 632-633F
desoxiazúcares, 231
  abreviaturas, 231T
  estructuras de, 232F
desoxicitidilato (dCMP), 588, 589F, 589T
desoxicitidina, 587, 588F
desoxicitidina difosfato (dCDP), 569
desoxicitidina trifosfato (dCTP), 632-633F
6-desoxi-L-galactosa (Fuc, fucosa), 231T, 232F, 245
2-desoxi-, β-D-ribofuranosa (desoxirribosa), 9F, 232F, 584F
desoxiguanilato (dGMP), 589F
desoxiguanosina trifosfato (dGTP), 569, 570T, 632-633F
desoxiguanosina, 587, 588F
desoxihemoglobina, 118, 120F, 122F. *Ver también* hemoglobina
desoximioglobina, 118. *Ver también* mioglobina
desoxirribonucleasas (DNasas), 605. *Ver también* endonucleasas; exonucleasas
desoxirribonucleósido-5'-monofosfato
  estructura de, 589F
  nomenclatura, 589T
desoxirribonucleósido-5'-trifosfato (dNTP), 619
desoxirribonucleósidos, 588, 589T
desoxirribonucleótidos, 584
desoxitimidilato. *Ver* dTMP
desoxitimidina (timidina), 587
  en síntesis de dUMP, 571, 573
  estructura del, 588F
^{3}H-desoxitimidina, 623F
2'-desoxitimidina 5'-monofosfato. *Ver* dTMP
desoxitimidina trifosfato (dTTP), 312, 569, 570T, 632-633F
desoxiuridina monofosfato (dUMP), 569
despeje del promotor, 656
desplazamiento de protones, 455, 467
desplazamiento sobre el cromosoma, 733F
desplazamiento, en elongación de cadena peptídica, 701-702, 704F
despurinación, 635
desvío de la hexosa monofosfato. *Ver* ruta pentosa fosfato
detergentes, 32F, 33F, 108
dexosirribosa (2-desoxy-, β-D-ribofuranosa), 9F, 232F, 584F
dextrinas, 472
dextrinas límite, 239, 373, 375F
dextrosa. *Ver* glucosa
DFP (diisopropilo fluorofosfato), 148F
dGMP (2'-desoxiguanosina 5'-monofosfato, desoxiguanilato), 589F
dGTP (desoxiguanosina trifosfato), 569, 570T, 632-633F
diabetes de inicio en el adulto, 516
diabetes gestacional, 516
diabetes mellitus (DM), 516
diabetes mellitus insulinodependiente (IDDM), 516
diabetes mellitus Tipo 1, 516
diabetes mellitus Tipo 2, 516
diabetes no insulinodependientes (NIDDM), 516
diacilglicerol
  en la ruta de señalización del inositol-fosfolípido, 288-289
  estructura del, 289F
1, 2-diacilglicerol, 486F
diagrama de energía, 161F, 162F, 169F
diagrama de Ramachandran, 92
diálisis, 68
dicarboxilato translocasa, 438F
2', 3'-dideoxinucleósido trifosfato (ddNTP), 632-633F
dideoxinucleótidos, secuenciación del ADN mediante, 632-633F
2, 4-dienoíl-CoA reductasa, 505-506F
difosfatidilglicerol (cardiolipina), 260F, 506
difosfato de citidina (CDP), 196
difusión
  caminata aleatoria de, 22
  de lípidos a través de la bicapa, 272-273F
  transporte de membrana y, 278, 281
difusión facilitada (transporte pasivo), 281F
difusión lateral, 271-272F
difusión transversa, 272F
dihidrobiopterina, 547F
dihidroceramida (*N*-acilefinganina), 492F
dihidrofolato, 571-573F
dihidrofolato reductasa, 571-573
7, 8-dihidrofolato, 209F
dihidrolipoamida, 212
  en el metabolismo del piruvato, 386-389F
dihidrolipoamida acetiltransferasa, 212
  en el complejo del piruvato, 386
  regulación del ácido cítrico y, 404-405F
dihidrolipoamida deshidrogenasa, 399, 544
  en el complejo del piruvato, 388F
  regulación del ácido cítrico y, 404-405F
dihidrolipoamida succinil transferasa, 399
dihidroorotato, 564-566F
dihidroorotato sintasa, 564F, 566
dihidropirimidinasa, 579-580F
dihidropteridina reductasa, 546, 547F
dihidrotimina, 579F
dihidrouracilo, 579-580F
dihidrouracilo deshidrogenasa, 579-580
dihidrouridilato (D), 673F, 686F, 687
dihidroxiacetona, 223-224F, 225-226F
dihidroxiacetona fosfato (NADH)
  en el mecanismo de reacción de la triosa fosfato isomerasa, 167-169F
  en glicólisis, 328, 330F, 331F, 334, 335-336F, 350-351F
  en gluconeogénesis, 362, 363, 364F
  en lanzadera de glicerol fosfato, 437F
  en síntesis de lípidos, 490, 491F
  estructura de, 232F, 330F, 331F
  síntesis de sacarosa y, 472F
dihidroxiacetona fosfato aciltransferasa, 491F
1, 25-dihidroxivitamina D_3, 498F
diisopropilfosforil-quimotripsina, 148F
dímeros de pirimidina, 635-636
dimetilalil pirofosfato, 496-497F

2, 4-dinitrofenol, 419F
dinucleótido, estructura de, 10F
dióxido de carbono
  a partir de la ruta pentosas fosfato, 368
  a partir del catabolismo del ácido úrico, 578
  activación de la Rubisco por, 467
  en la fotosíntesis, 464-471F
  en la síntesis de nucleótidos de purina, 558
  en reacciones enzimáticas, 132F
  fijación nocturna del, 474-476F
  liberación durante la síntesis de ácidos grasos, 481-482, 483F
  polaridad de, 27F
  producción de, durante la síntesis del esfingolípidos, 491
  transporte de tejidos a pulmones, 123
  unión del oxígeno a la hemoglobina y, 122
  y fotorrespiración, 469, 473-474, 475
  y ruta C_4, 474, 475F
  y sistema amortiguador de la sangre, 48-49F
dipéptido, estructura general, 6F
dipolo, 27
2,4-dioxo-5-metilpirimidina. *Ver* timina
2,4-dioxopirimidina. *Ver* uracilo
disacáridos, 222
  azúcares reductores y no reductores, 236
  estructuras de la, 234-236F
  otros glucósidos, 234-236F
diseño estructural de hélice enrollada, 99F
diseño racional de medicamentos, 146
disolución neutra, 40
distorsión, 175
distrofia muscular de Duchenne, 739
DnaA, 629-630F
DnaB, 626
DnaK, 113, 114
dNTP (desoxirribonucleósido 5'-trifosfato), 619
doble hebra, 590-597F
doblez o pliegue, 101
Dobzhansky, Theodosius, 15
dodecanoato (laurato), 255T, 256F
Dogma Central, 3, 648
dominios, 87, 100-104F
  estructura y función, 104
  variable, 123-124F
dominios variables, de anticuerpos, 123-124F
dominios α, 101
Drosophila melanogaster, 85
  genoma, 298
  inhibición enzimática y, 146
dTMP (2'-desoxitimidina 5'-monofosfato, desoxitimidilato)
  en la recuperación de la purina y pirimidina, 573F-574
  estructura de, 589F
  síntesis de, 570-573F
dTTP (desoxitimidina trifosfato), 312, 569, 570T, 632-633F
dUDP (desoxiuridina difosfato), 569, 570, 571
dUMP (desoxiuridina monofosfato), 569, 570-573F
E. coli. *Ver*, *Escherichia coli*
*Eco*RI, 609T
  en la preparación del ADN recombinante, 723F, 724
  sitio de metilación y restricción, 609F
  unión de ADN de, 610F
ecuación de Henderson-Hasselbalch, 43, 64
ecuación de Michaelis-Menten, 135F-139T
  derivación de, 136-138
ecuación de Nernst, 320-21
ecuaciones de velocidad, 133-34
  ecuación de Michaelis-Menten, 135F-139T
Edidin, Michael A., 272
Edman, Pehr, 73
EF-1a, 705
EF-1b, 705
EF-2, 705
efecto Bohr, 123F
efecto de proximidad, 172, 185
  reacciones multisustrato y, 171
  serina proteasas y, 185
efecto hidrofóbico, 32
  bicapas lipídicas y, 270
  de plegamiento de proteínas, 110-111F
  en doble hélice, 595
efecto Pasteur, 350
efector alostérico, 121, 122
efingosina 1-fosfato, 290
EF-Ts, 700, 702F, 705
EF-Tu, 699-700F, 701F, 705
EF-Tu-GTP, 699-700F, 702F
eicosanoides, 254F
  estructuras de, 266F
  síntesis de, 488-490
eicosatrienoíl CoA, 484F
eIF (factores de iniciación eucariota)
  eIF-2, 708F
  eIF-4, 697
elastasa, 182F, 183F, 184
elastina, 184
electrófilo, 36, 159
electroforesis, 69-70F
electroforesis en gel de la poliacrilamida (PAGE), 69-70F
electrólitos, 30
elementos genéticos móviles. *Ver* transposones
elementos reversibles. *Ver* transposones
elongación de cadena
  en la síntesis del ARN, 650-652F
  en replicación de ADN, 618, 619-620F
  en síntesis de proteínas, 697-705
    formación del enlace peptídico, 700, 703F
    inserción aminoacil-ARNt en el sitio A, 699-700F
    traslocation, 702
elongasa, 484F
eluido, 68
empacamiento del ADN bacteriano, 604
empalme, 674, 677-678F, 680
  en reparación de ADN, 636, 637F
enantiómeros, 54, 223, 225
enantiómeros D, de azúcares, 225
endocitosis, 283-284F
  metabolismo de proteínas y, 511
endonucleasa RecBCD, 640
endonucleasas, 605. *Ver también* RNasas
  AP-endonucleasa, 637, 642
  escisión-reparación, 636-637F
  UvrABC, 636
endonucleasas de restricción del tipo II, 608
endonucleasas de restricción tipo II, 608
endonucleasas de restricción, 608-609F
  en la preparación del ADN recombinante, 721, 722F, 733F
  especificidades de, 608
  tipo I y tipo II, 608
  unión a ADN, 608
  usos de, 610-612F
endorfinas, 67
endosoma, 284
energética
  de la síntesis de proteínas, 705
  de la vida, 11-15F
energía
  activación, 161F
  ATP como transportador de, 310-317
  almacenada en el gradiente de concentración de protones, 418, 419
  conservada en el ciclo del ácido cítrico, 393F
  transferencia de, en metabolismo, 300
energía de activación, 161F
enfermedad de Cori, 378
enfermedad de Fabry, 493
enfermedad de Farber, 493
enfermedad de Gaucher, 493
enfermedad de Krabbe, 493
enfermedad de la orina con olor a jarabe de maple, 548
enfermedad de McArdle, 378
enfermedad de Niemann-Pick, 493
enfermedad de Sandhoff, 493
enfermedad de Tay-Sachs, 264, 493
enfermedad de von Gierke, 378
enfermedad, inhibición enzimática para el tratamiento de la, 146
enfermedades de almacenamiento lisosomal, 493
enfermedades de deficiencia en la dieta, 194T
enfermedades metabólicas, 323-324
enlace
  fosfoanhídrido, 4
  fosfodiéster, 9, 10F, 590-592F
enlace amida, 4, 6F
enlace amida-carbonilo, 112T
enlace amida-de nitrógeno imidazol, 112T
enlace amida-hidroxil, 112T
enlace glicosídico, 8F, 9, 234, 586-587
enlace hidroxilo-carbonilo, 112T
enlace hidroxilo-hidroxilo, 112T
enlace *N*-acetilgalactosamina-serina, 246F
enlace *N*-acetilglucosamina-asparagina, 246F
enlace *N*-glucosídico, 234, 236
enlace peptídico, 6
  aminoácidos y, 66-67F
  estructura de, 90F
  formación de, 700-711F
enlace b-*N*-glucosídico, 586-587
enlaces covalentes
  en doble hélice, 595
  de molécula de agua, 27F
enlaces dobles, ácidos grasos, 254, 255T
enlaces éster, 4
enlaces éter, 4
enoíl-CoA isomerasa, 505-506F
2-enoíl-CoA, 499F, 500, 502
  en β-oxidación, 505F
enol piruvato, 339-340F
enolasa (2-fosfoglicerato deshidratasa), 331F, 339-340
enolato piruvato, 207F
entalpía (H), 308
entropía (S)
  e interacciones hidrofóbicas, 36F
  y cambio de energía libre, 308
  y el efecto de proximidad, 172
  y el efecto hidrofóbico, 111
envenenamiento con arseniato, 340
envoltura nuclear, 18, 19F
enzima biosintetizadora del triptófano, 103F
enzima de ajuste inducido, 181F
enzima de división del agua. *Ver* complejo productor de oxígeno
enzima efectora, 285
  proteínas G y, 287
enzima en una muestra, 134
enzima III, 670F
enzima ramificadora (amilo-(1, 4-1, 6)-transglucosilasa), 372
enzima UvrABC, 636

enzimas, 2, 6-7, 129-57. *Ver también* coenzimas, sustratos
activadas por metal, 193
alostéricas, 149-153F
fosfofructocinasa, 149-150F
propiedades de, 150-152F
teorías de regulación, 152-154F
canalización de metabolitos, 527
cationes inorgánicos y, 193
clases de, 130-132
complejos multienzimáticos, 154
constantes cinéticas de, 139F-140T
distributiva, 621
ecuación de Michaelis-Menten, 135F-139T
especificidad de, 140
teoría de la llave y cerradura, 176
fijación de sustratos proquirales a, 397
gluconeogénicas, 365
inhibición de, 141
inhibición irreversible de las, 147-148F
inhibición reversible de, 142T-147F
interconvertibles, 376-379F
límite superior de la catálisis mediante, 167T
multifuncionales, 154
pH y velocidades enzimáticas, 166-167F
procesivas, 621
propiedades de las, 132-135
proteínas como, 53
ramificación, 372
reacciones de difusión controlada, 167F-171T
regulación de, 148-154F
serina proteasas, 182-187F
especificidad de sustrato de, 183-184F
mecanismos catalíticos de, 182-187F
propiedades de, 182-187F
zimógenos como precursores inactivos de enzimas, 182F
sitios activos, 104
unión de sustratos a, 172-174F
velocidades de reacción química y, 15-16
y ajuste inducido, 174-175
y análogos de estado de transición, 176-178F
y catálisis ácido-base, 164-165F
y catálisis covalente, 165-166F
y cinética enzimática, 134-135
y cofactores, 192-193F
y disminuyen la energía de activación, 161
y efecto de proximidad, 172-173
y estabilización de estado de transición, 175-178F
enzimas activadas por metales, 193
enzimas alostéricas
fosfofructocinasa, 149-150F
inhibición entre, 146
propiedades de las, 150-152F
enzimas de difusión controlada, 167F-171T
enzimas distributivas, 621
enzimas gluconeogénicas, 358-359F
enzimas interconvertibles, 154F, 302
modificación covalente de, 154F
regulación intracelular del metabolismo del glucógeno y, 376-379
enzimas procesivas, 621
enzimas reguladoras, 130, 149
epímeros, 225
epinefrina (adrenalina)
almacenamiento y movilización de ácidos grasos y, 507
estructura de, 61F
oxidación de ácidos grasos y, 507-508F
y regulación del metabolismo del glucógeno, 375, 376F, 377F
equilibrio, 13, 308
ergosterol, 265F
eritrocitos
formación del 2, 3-*bi*fosfoglicerato en, 338F
glicólisis y, 343F
y hemoglobina, 117F
eritromicina, 707
eritropoyetina, 739
eritrosa, 224F
eritrosa 4-fosfato, 367F, 370F, 532-533F
eritrulosa, 225, 226F
Escherichia coli, 23F
ATCasa, 566-567F
chaperonina, 113-114F
componentes del complejo piruvato deshidrogenasa, 389
contenido de ARN, 648, 649T
genoma, 298
glicerofosfolípidos de membrana, 259
isocitrato deshidrogenasa, actividad en, 409F, 410F
isomerasa de disulfuro (DsbA), 109
precursores ARNr, 673F
proteínas, 85F
recombinación en, 640-641F
replicación de ADN en, 617F
represor *lac*, 668F
ribosomas, 693F
síntesis de nucleótidos de purina en, 559
síntesis de proteína ribosomal en, 496-497F
transcripción de genes del ARN ribosómico, 654F
transcripción y traducción, 699F
transporte activo secundario en, 282F
escorbuto, 194T
escualeno, 495
conversión a colesterol, 496
conversión a isopentenil pirofosfato, 496-498F
escualeno sintasa, 497F
esfera de solvatación, 30
esfinganina, 492F
esfinganina *N*-aciltransferasa, 492F
esfingolípidos
descripción de, 253, 262-264F
en organización lípida, 254F
estructura de, 262F
serina como precursor de, 537F
síntesis de, 491-494F
esfingolipidosas, 493
esfingomielinas, 254F, 262-263, 492F
en membranas, 271
estructura de, 262F
esfingosina (4-*trans*-esfingenina)
en esfingolípidos, 262
en síntesis de lípidos, 491, 494
estructura de, 262F
serina como precursor de, 537F
transducción de señal y, 290
espacio periplasmático, 17F
especificidad de reacción, 130
especificidad, de enzima, 140
espectroscopia NMR (espectroscopia de resonancia magnética nuclear), 89, 323
espliceosoma, 678-680F
esquema-Z, 458F
estabilización del estado de transición, 171, 175-178F, 185
estado de transición, 159
estabilización de, mediante catálisis, 160-162F
para reacción biomolecular, 181F
estado estable, 309
estado estándar, 308
estado R (relajado), 121, 122, 152-153F
estado T (tenso), 121-122, 151, 152F
estearoil CoA, 484-485, 502
éster fosfato, 5F
esterato (octadecanoato), 255T, 256-258F, 502-503
estereoespecificidad, 130
estereoisómeros, 54, 58F
ésteres, 256-258
fórmula general de, 5F
ésteres de colesterol
colesterol como precursor de, 264
en lipoproteínas, 511F
estructura de, 276F
ésteres de linoleoílos, 258
esteroides
acción de los, 264
colesterol como precursor de, 264, 496
descripción de, 10, 264
en organización lípida, 254F
estructura de, 265F
transducción de señal y, 285
esterol, 264
estigmasterol, 265F
estomata, 474
estreptomicina, 707
estroma, 21F, 460-464F
estructura de azúcares, 233F
estructura de haz de hélices, 99F
estructura de HMG-CoA, 494
estructura de hoja de trébol, del ARNt, 686
estructura de horquilla (en proteínas), 99F, 100
estructura de meandro-b, 99F, 100
estructura hélice-asa-hélice, 99F
estructura hélice-giro-hélice, 99, 668, 670, 671F
estructura primaria
de proteínas, 66, 86F
estructura terciaria y, 109
evolución y, 78-80F
plegamiento de proteínas y, 110, 112
estructura secundaria
de proteínas, 86F. *Ver también* hélice α
estructura β 102F
estructura supersecundaria (motivo estructural), 99F
estructura terciaria, de proteínas
descripción de, 86-87F
determinación de, 98-104F
etanol
a partir del piruvato, 341F, 342F
solubilidad en agua, 31T
etanolamina, 261F, 490
etapa hexosa, de la glicólisis, 328
etapa triosa, de glucólisis, 328
éter, fórmula general del, 5F
éteres de alquilo, plasmalógenos a partir de, 491F
ETF (flavoproteína para la transferencia electrónica), 499F, 500, 544
eucariotas, 16
alargamiento de cadena en, 705
ciclo del glioxilato en, 409
cromatina, 599-604F
difusión de membrana lipídica en, 271
en síntesis de nucleótidos de pirimidina, 564-567F
endocitosis y exocitosis en, 283
enzimas del ciclo del ácido cítrico, 385
esteroides en, 264
expresión de proteínas en, 734-735, 736F
fotosintéticos, 445
genoma, 584
iniciación de traducción en, 699
membrana plasmática, 271F
procesamiento del ARNm en, 674-680F

proteínas ancladas por lípidos a membrana en, 277
recambio de proteínas en, 538
replicación del ADN en, 616-617, 630T-634F
ribosomas, 693
selección en, 727
síntesis de ácidos grasos en, 480-481, 484, 485
síntesis de lípidos en, 499-500
síntesis de nucleótidos de purina en, 559
síntesis del citrato y ácido graso en, 406
transcripción en, 659F-663T
velocidad de, 699
transporte de proteínas en, 712-716F
evolución
ancestro común, 684
bioquímica y, 15-16
conservación de estructura de proteínas y, 100-101
de fosforilación, 340
de mitocondria y cloroplastos, 21
estructura primaria de proteínas y, 78-80F
rastreo mediante la reacción en cadena de la polimerasa, 743F
último ancestro común, 55
exocitosis, 283-284
exones, 677-678F
exonucleasas, 605F, 621-622. *Ver también* RNasas
experimentos cinéticos, en propiedades enzimáticas, 132-135F
expresión del gen constitutivo, 663
expresión génica, proteínas y, 53. *Ver también* tecnología de ADN recombinante
constitutiva, 663
regulación durante la traducción, 705-706
extremos modificados, 674-676F
Factor 5 (RAP30/74, TFIIF), 661T, 662F
factor de coagulación VIII, 739
factor de especificidad de corte y poliadenilación (CPSF), 674, 676F
factor de transcripción (CTF, NF1) de caja CCAAT, 661T
factor intrínseco, 211
factores de crecimiento, 284
factores de elongación, 699-700F
factores de iniciación, 696-697
factores de liberación, 705
factores de nodulación, 243
factores de transcripción (TFs), eucariótico, 661F-65T. *Ver también factores específicos de transcripción*
factores de transcripción del ARN polimerasa II, 660-662T, 662-663
FAD. *Ver* flavina adenina dinucleótido
$FADH_2$. *Ver* flavina adenina dinucleótido
fago, 16. *Ver también* bacteriófago
FAICAR (formamidoimidazol carboxamida ribonucleótido), 560
familia GLUT, 344-346F
familias, de proteínas, 101
farnesil pirofosfato, 496-497F
Fd. *Ver* ferredoxina
Fe(II)protoporfirina IX, grupo hemo, 116F
fenilalanina, 58F, 76, 77F
con par de bases a ARNt, 688
degradación de, 176, 546-547F, 548
en síntesis de la tirosina, 532F
requerimiento energético para la síntesis, 534T
síntesis de, 531-533
fenilalanina hidroxilasa, 546-547F
fenilcetonuria (PKU), 546
fenilisotiocianato (PITC), 72-73F, 74F
fenilpiruvato, 546
feniltiocarbamoílo-péptido, 74F
fenol, 164T
feofitina *a* (Ph *a*), 458F
Fe-proteína, 522-523
ferredoxina (Fd)
composición de aminoácidos, 72T
en fotosíntesis, 454F, 455F, 458F, 464
fijación de nitrógeno y, 522
ferredoxina reducida, 522
ferredoxina-$NADP^+$ oxidorreductasa, 454, 458F, 464
Fe-S. *Ver* grupos hierro-azufre
FGAM (formilglicinamidina ribosil-5-fosfato), 560F
FGAR (formilglicinamida ribosil-5-fosfato), 560F
ficobilinas, 448-449F
ficocianina, 448F
ficoeritrina, estructura de, 448F
fijación de nitrógeno, 521-523F
fijación nocturna del dióxido de carbono, 474-476F
filamentos de actina (microtúbulos), 22F
filoquinona. *Ver* vitamina K
fimbrias, 17F
Fischer, Emil, 2, 3, 134, 176
flagelo, 17F, 22, 53, 85
flavina adenina dinucleótido ($FAD/FADH_2$), 195T, 319
como una coenzima, 200-201F
en β-oxidación, 499-500F
en el metabolismo del piruvato, 387-389F
en la degradación de aminoácidos, 542
en la síntesis de óxido nítrico, 537
en lanzadera del glicerol fosfato, 437F
en sistema de escisión de la glicina, 543F
en transporte de electrones, 424, 426, 427F
flavina mononucleótido ($FMN/FMNH_2$, riboflavina 5'-fosfato), 195T, 319
como una coenzima, 200-201F
en el transporte de electrones, 424-425F
en síntesis de óxido nítrico, 537
potencial de reducción estándar de, 423T
flavodoxina, 103F
flavodoxina reducida, 522
flavoenzimas (flavoproteínas), 201
flavoproteína para la transferencia de electrones (ETF), 499F, 544
flavoproteínas (flavoenzimas), 201
Flemming, Walter, 599
flujo, 301-302
flujo de energía, 12F
flujo de información biológica, 648F
5-fluorouracilo, 572F
fluorofosfato de diisopropilo (DFP), 148F
fMet-$ARNt_f^{Met}$ *N*-formilmetionil-$ARNt_f^{Met}$, 695F
FMN oxidorreductasa, 103F
FMN. *Ver* flavina mononucleótido
$FMNH_2$. *Ver* flavina mononucleótido
folato (pteroilglutamato, vitamina B_c), 194T, 195T, 208F
formaldehído, 209F
formamidoimidazol carboxamida ribonucleótido (FAICAR), 560F
formas con clave griega, 99F, 100
formato, 558
formilglicinamida ribosil-5-fosfato (FGAR), 560F
formilglicinamidina ribosil-5-fosfato (FGAM), 560F
5-formiltetrahidrofolato, 209F
10-formiltetrahidrofolato
en la formación de fMet-$ARNt_f^{Met}$, 695
en síntesis de nucleótidos de purina, 558-560F
formiltransferasa, 695
interconversión con tetrahidrofolato y sus derivados, 209F
5-formiminotetrahidrofolato, 209F
en degradación de aminoácidos, 541-542F
fórmula general del, 5F
fosa termodinámica, 174
fosfágenos, 316
fosfatasa alcalina, 140T
fosfatidato fosfatasa, 486-487F
fosfatidilcolina, 260F
en la síntesis de esfingolípidos, 492F, 506
en organización lípida, 254F
estructura de, 261F
serina como precursor de, 537F
fosfatidiletanolamina, 260F
en organización lípida, 254F
estructura de, 261F
serina como precursor de, 537F
síntesis de, 486F, 487-488F, 506
fosfatidilglicerol
en membranas, 271
estructura de, 260F
fosfatidilinosítido 3-cinasa, 291-292F
fosfatidilinositol, 254F, 260F, 289-290F, 487F, 506
fosfatidilinositol sintasa, 487F
fosfatidilinositol 4-fosfato (PIP), 488
fosfatidilinositol 3, 4, 5-*tris*fosfato (PIP_3), 291-292F
fosfatidilinositol 4, 5-*bi*fosfato (PIP_2), 289
en señalización transmembrana, 290F
estructura de, 289F
mediación de vía insulina, 291-292
síntesis a partir del fosfatidilinositol, 488
fosfatidilinositoles (PI)
en organización lípida, 254F
en síntesis de PIP y PIP_2, 288, 289F
estructura de, 260F
síntesis de, 487F
fosfatidilserina, 260T
en membranas, 271
en organización lípida, 254F
estructura de, 261F
serina como precursor de, 537F
síntesis de, 487-488F, 506
fosfatidilserina carboxilasa, 487-488F
fosfatidilserina decarboxilasa, 488F, 506
fosfatidilserina sintasa, 487F
fosfato
en fosfatos de azúcar, 231
estructura del, 131F, 286F
fórmula general del, 5F
fosfatos de azúcar, 231, 232F
fosfato de bromohidroxiacetona, 147, 148F
3-fosfato deshidrogenasa, 437F
fosfato, inorgánico (P_i),
a partir de la hidrólisis del ATP, 310F-311T
en la síntesis de ácidos grasos, 486F
especies iónicas de, 46
estructura de, 261F
formación de, 487-488F
fosfatidato, 254F, 259, 260T
transporte a través de la membrana mitocondrial interna, 435
valores K_a y pK_a de, 43T
y regulación de la fosforilación oxidativa, 435F
y regulación de la síntesis de almidones, 471F

fosfoanhídrido, 9
  fórmula general de, 5F
fosfoarginina, 315T, 316F
fosfocinasa-1, fructosa 2,6-*bi*fosfato, 361
fosfocolina transferasa, 486F, 491F
fosfocreatina, 315T-316F
fosfoenolpiruvato (PEP), 150F
  ciclo del sustrato y, 365F
  como precursor de aminoácidos, 540F
  en CAM, 474-476F
  en glicólisis, 340F
  en síntesis del corismato, 532F
  energía libre estándar de hidrólisis para, 315T
  estructura de, 331F
  función en la gluconeogénesis, 358-359F
  producción de ATP y, 315T, 316F
fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEP carboxilasa), en ruta del C_4, 474, 475F
fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEP carboxiquinasa)
  citosólica, 364F
  en gluconeogénesis, 359F, 360-361
  mitocondrial, 364F
fosfoenolpiruvato-sistema fosfotransferasa de azúcar dependiente, 670F
fosfoetanolamina, 486F
fosfofructocinasa, 150F, 151, 153
fosfofructocinasa-1 (PFK-1), 150-151F
  efecto sobre el ADP, 347-348F
  en glicólisis, 330F, 333-334
  piruvato cinasa y, 348-349F
  regulación de, 347-348F
fosfofructocinasa-2 (PFK-2), 348
2-fosfoglicerato, 331F, 337-338F, 339F
3-fosfoglicerato
  como precursor de aminoácidos, 529
  en glicólisis, 337F, 338F, 339F, 340F
  en síntesis de la serina, 530F
  estructura de, 331F
fosfoglicerato cinasa
  en glicólisis, 331F, 337, 338F
2-fosfoglicerato deshidratasa (enolasa), 331F, 339
3-fosfoglicerato deshidrogenasa, 530F
fosfoglicerato mutasa, en glicólisis, 331F, 337-339F
2-fosfoglicolato, 177F
fosfoglucomutasa, 351F, 371
  en interconversión de la glucosa 1-fosfato y glucosa 6-fosfato, 351F, 371F
  en síntesis de la sacarosa, 472F
6-fosfogluconato, 367-368F
6-fosfogluconato deshidrogenasa, 368F
6-fosfogluconolactona, 367-368F
3-fosfohidroxipiruvato, 530F
fosfoinosítido-fosfolipasa específica C, 288-289F
fosfolipasa A, 510F
fosfolipasa A_1, 261F
fosfolipasa A_2, 261F, 510F
fosfolipasa C, 261F
fosfolipasa D, 261F, 290
fosfolípidos, 253, 262. *Ver también* glicerofos-folípidos; esfingomielinas
  en membranas, 271
  en organización lípida, 254F
  neutros, 486-487F
fosfolípidos ácidos, 487F
fosfolípidos neutrales, 487F
fosfomanosa isomerasa, 352F
fosfomevalonato, 495F
fosfomevalonato cinasa, 495F
fosfopanteteína, 202F
fosforilación, 302, 303F
  complejo piruvato deshidrogenasa, regulación por, 405F
  modificación covalente de, 153-154F
fosforilación nivel-sustrato, 337
fosforilación oxidativa, 307F, 415-439
  complejos de proteínas en, 421-435F
  desacomplamiento de, 419, 435
  en mitocondria, 416-418F
  generalidades de, 416F
  producción de ATP, 404F
  síntesis de ATP vía, 415, 416, 419-421F, 432-435F, 437, 439
  teoría quimiosmótica, 418-420F
  transporte de electrones mediante la respiración en, 422F-432
  y fuerza protonmotriz, 420-421F
fosforilasa *a*, 373
fosforilasa *b*, 373
fosforilasa cinasa, 376, 377F
fosforilasas de polisacárido, 372-373
fosforilo, fórmula general de, 5F
fósforo, 3
  radio de van der Waals, 35T
fosforólisis, 373-374, 375F
fosforribosil-ATP, 535F
5-fosforribosil 1-pirofosfato (PRPP)
  en recuperación de la purina, 573-574F
  en síntesis de histidina, 535F
  en síntesis de IMP, 558-560F
  en síntesis de nucleótidos de pirimidina, 566
  en síntesis de triptófano, 534
  síntesis de, 558-560F, 563-566
5-fosfo-β-D-ribosilamina (PRA), 560F
fosforribulocinasa, 466F
3-fosfoserina, 530F
3-fosfoserina fosfatasa, 530F
fosfoserina transaminasa, 530F
fotodimerización, 635F
fotón, 446
fotorreactivación, 635
fotorrespiración, 469, 473-474, 475
fotosíntesis, 12, 52, 444-476
  carbohidratos y, 222
  ciclo de RPP, 467F
  componentes participantes en, 464F
  oxigenación de la ribulosa 1,5-*bi*fosfato, 469F
  pigmentos implicados en, 445-449F
  procesos de, 444
  reacción neta de, 444
  reacciones oscuras, 444
  ribulosa 1,5-*bi*fosfato carboxilasa-oxigenasa, 465-469F
  ruta de la pentosa fosfato y, 369
  rutas adicionales de fijación de carbono de, 473-476
    fijación nocturna del CO_2, 474-476F
    ruta del C_4, 474
  transporte cíclico de electrones en, 464
  y CAM, 474-476F
  y cloroplastos, 463-464F
  y síntesis de la sacarosa y almidón, 471-473F
fotosistema I (PSI)
  descripción del, 449, 452F
  en fotosíntesis, 452-455F, 458-459, 464F
fotosistema II (PSII), 449-452F
fotosistemas, 449
fracción flotante, 67
fraccionamiento, 67-68
fragmento central, 724
fragmento de Klenow, 624F, 632
fragmentos de Okazaki, 623, 624F
  unido por ADN polimerasa I y ADN ligasa, 624-626F
Franklin, Rosalind, 590, 597
frecuencia de error, de síntesis de ARN, 652
fructocinasa, 350F
fructosa (Fru, levulosa), 223, 366F
  abreviatura, 231T
  conversión a gliceraldehído 3-fosfato, 350-351F
  estructura de, 226F
fructosa 1, 6-*bi*fosfatasa, 361, 364, 365
fructosa 1, 6-*bi*fosfato (PFK-I), 150F
  ciclo de sustrato y, 365F
  en gluconeogénesis, 358-359F, 361, 364, 365F
  en síntesis de la sacarosa, 472F
  estructura de, 330F
  y regulación de la glicólisis y gluconeogénesis, 328, 329, 333-336F
fructosa 1-fosfato aldolasa, 350F
fructosa 1-fosfato, 350F
fructosa 2, 6-*bi*fosfato (PFK-2)
  actividad de la fosfofructocinasa-1 y, 348
  en síntesis de sacarosa, 472F
  estructura de, 348F
  y regulación de la glicólisis y gluconeogénesis, 334, 344, 365F
fructosa 6-fosfato, 150F
  ciclo del sustrato y, 365F
  conversión a partir de manosa, 352F
  en glicólisis, 333F
  en gluconeogénesis, 359F, 361, 364-365F
  en ruta de la pentosa fosfato, 366-368F
  en síntesis de la sacarosa, 472F
  estructura de, 330F
  inhibición de la glucocinasa y, 347
Frye, L. D., 272
fucosa (6-desoxi-L-galactosa, Fuc), 231T, 245
fuerza electromotriz, 319F, 320
fuerza protonmotriz, 420-421F
fuerzas de dispersión de London. *Ver* fuerzas de Van der Waals
fuerzas de van der Waals, 35F-36T
  como fuerzas de unión en reacciones enzimáticas, 171, 172
  en ácidos grasos, 256
  en plegamiento y estabilización de proteínas, 112
  estabilidad del ADN de, 595
fuerzas débiles, 33
fugas de protones, 435
fumarasa (fumarato hidratasa)
  constante de velocidad aparente de segundo orden para, 167T
  constante de velocidad de, 140T
  en ciclo del ácido cítrico, 401-402
  en el ciclo del glioxilato, 408F
fumarato
  complejo succinato deshidrogenasa y, 401
  conversión a partir de la fenilalanina y tirosina, 547F
  en catabolismo de purinas, 578F
  en el ciclo de ácido cítrico, 385, 540F
  en el ciclo de la urea, 550, 551F, 552F
  en el ciclo de la glucosa-alanina, 363
  en el ciclo del glioxilato, 408F
fumarato reductasa, 439-440F
Funk, Casimir, 194
furano, 227F
furanosa
  conformación de, 229-230F
  definición de, 227
galactocerebrósidos (galactosilceramidas), 263F
galactocinasa, 351F
galactosa (Gal)
  abreviatura, 231T

conversión a glucosa 1-fosfato, 351-352F
en glicoproteínas, 245
estructura de, 224F
galactosa 1-fosfato uridililtransferasa, 351F, 352
galactosamina, 231T
galactosemia, 352
galactosilceramidas (galactocerebrósidos), 263
galactosilglucosa. *Ver* lactosa
GalNAc. *Ver N*-acetilgalactosamina
gamma cristalina, 102F
Gamow, George, 683
ganglióside G_{M2}, 263F
gangliósidos, 231, 254F, 262, 263, 493, 494
gangliosidosis generalizada, 264, 493
gases neurotóxicos, 147
GDP (guanosina 5'-difosfato), 312
como transductor de señal, 286-287
cromatografía de filtración en gel, 69,105
en elongación de cadena, 701F
estructura de, 286F
GEF (factor de intercambio de guanina nucleótido), 708
gen *lac*A, 665
gen *lacY*, 665
gen *lacZ*, 665, 728
gen triosa fosfato isomerasa, 677F
gen(es). *Ver también* ADN, código genético; genoma; transcripción
definición, 647
doméstico, 647
marcador, 724-725F, 726F
metabolismo y, 297-298
orientación de, 652-653F
relación con las proteínas, 647-648
genes domésticos, 647
genes marcadores, 727
genes saltarines. *Ver* transposones
genomas, 297, 583-584, 595
Haemophilus influenzae, 737
proyecto genoma humano, 728
girasa (topoisomerasa II), 626
giro β tipo I, 98F
giro β tipo II, 98F
giro común (giro tipo I), 98F
giro tipo I (giro común), 98
giro tipo II (giro de glicina), 98
giros inversos, 98F
giros, 97-98F
giros β, 98F
Glc. *Ver* glucosa
GlcA (glucuronato), 233F
GlcN (glucosamina), 231T, 232F
GlcNAc. *Ver N*-acetilglucosamina
gliceraldehído, 350F
estructura de, 223F, 224F, 225
gliceraldehído 3-fosfato (G3P)
en glicólisis, 328, 334-337F, 342F, 350F
en mecanismo de reacción para la triosa fosfato isomerasa, 167T-169F
en ruta pentosa fosfato, 366-368F
en síntesis del triptófano, 534, 535F
estructura de, 232F, 330F
fructosa, conversión a, 350-351F
interconversión catalizada por, transcetolasa-/transaldolasa, 370F
síntesis de la sacarosa y, 472F
gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
en el ciclo del ácido cítrico, 403
en glicólisis, 331F, 336-337F, 342F
unión del NAD al, 199
glicerofosfolípidos (fosfoglicéridos), 259-261F
clasificación de, 253, 485
en organización de lípidos, 254F
estructura de, 11F
lisofosfoglicérido a partir de, 510F
síntesis de, 485-488F
glicerol, 233
almacenamiento de ácidos grasos y, 507
como precursor gluconeogénico, 363, 364F
estructura de, 233F
glicerol 3-fosfato deshidrogenasa, 363, 364F, 437F
glicerol 3-fosfato
en gluconeogénesis, 363, 364F
en síntesis de lípidos, 486F
energía libre estándar de hidrólisis para, 315T
estructura de, 11F, 259
glicerol cinasa, 363, 364F
glicina (ácido 2-aminoacético)
cadenas laterales, 94
como amortiguador, 47
como residuo por giros, 98F
compuestos formados a partir de, 537F, 558
degradación de, 542
degradación de la treonina en, 543F
estructura de, 57F
requerimiento energético para la síntesis, 534T
síntesis de, 529-530F
glicinamida ribosil-5 fosfato (GAR), 560F
glicocolato, estructura del, 509F
glicoconjugados, 222, 241-249F
glicoproteínas, 244-249F
peptidoglucanos, 243-244F
proteoglicanos, 241-243F
glicoesfingolípidos, 253, 254F
en membranas, 270, 271F
glicogenina, 372
glicolípidos, en membranas, 270, 271F
glicólisis, 305F, 306, 327-356
cambio en la energía libre en, 343-344F
comparada con la gluconeogénesis, 358-359F, 364-365F, 379
en glóbulos rojos, 338F
fosfofructocinasa y, 149-150F
fructosa en, 350-351F
galactosa en, 351-352F
gluconeogénesis y, 357
manosa en, 352F
piruvato a partir de, 327, 328F, 340-342
producción de ATP, 404F
producción de ATP vía, 328-332F
reacciones enzimáticas de, 328F
regulación de, 344-350F
relación con el ciclo de la urea, 551
relación con la ruta de la pentosa fosfato, 368
relación con otras rutas metabólicas, 327-328F
síntesis de aminoácidos y, 526F
glicoproteína P, 282
glicoproteínas, 244-249F
en membranas, 270, 271F
glicosaminoglucanos, 241-243
estructura de, 237T
glicosilación de proteínas, 716F
glioxilato
en el ciclo del glioxilato, 408F, 409
glicina como precursor de, 537F
glioxisomas, 409
Gln, 60
globinas, 117
síntesis de, 707-708F
glóbulo fundido, 110
glóbulos rojos. *Ver* eritrocitos
Glu, 164, 168F
glucagón, 348, 375, 376F, 377F
cetogénesis y, 515
efecto sobre la glicólisis, 348-349F
efecto sobre la gluconeogénesis, 365
oxidación de ácidos grasos y, 507-508
regulación de la gluconeogénesis y, 365
glucano, 222
glucocinasa, 330F, 346-347F
glucógeno, 8, 237, 239
como fuente de energía almacenada, 479
degradación de, 372-374F
enfermedades de almacenamiento, 378
estructura de, 237T
función en el mantenimiento del nivel de glucosa, 380-381F
regulación del metabolismo del, 374-379F
enzimas interconvertibles y, 376-379F
por glucógeno fosforilasa y glucógeno sintasa, 375-376F
por hormonas, 375, 376F
síntesis de, 371-372F
vía de almacenamiento de energía, 306
glucógeno fosforilasa, 373-374F
glucógeno fosforilasa *a*, 378-379
glucógeno fosforilasa *b*, 373
regulación recíproca mediante la glucógeno sintasa, 374, 375, 376, 377F, 378F, 379
glucógeno sintasa, 371-372F, 374, 375
regulación recíproca mediante glucógeno fosforilasa, 374, 375, 376, 377F, 378F, 379
glucogenólisis, 366, 376
gluconato, 233F
gluconeogénesis, 357, 358-362F
a partir del propionil-CoA, 504
comparada con la glicólisis, 358-359F, 364-365F, 379
en inanición, 379-381
precursores de, 362-364F
reacciones de, 358-359F, 361, 363-364F
regulación de, 364-366F
relación con el ciclo de la urea, 550, 552
glucono-D-lactona, 233F
gluconolactonasa, 367F-368F
glucopiranosa, 234F
glucosa (dextrosa, Glc), 8, 306
a partir del almidón, 472
abreviatura, 231T
almacenamiento como almidón y glucógeno, 237
conservación de niveles de glucosa en mamíferos, 379-381
conversión a piruvato vía glicólisis, 328-330F
conversión a sorbitol, 366
disponibilidad de, 357
en glicoproteínas, 245
estructura de, 8F, 31F, 224F, 225F, 330F
regulación del operón -*lac* mediante, 668, 669, 670F
glucosa 1-fosfato, 231, 315T
conversión a partir de la galactosa, 351-352
en síntesis de almidón, 471F
en síntesis de sacarosa, 472F
estructura de, 232F
metabolismo de, 375F
glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, 368-369F
glucosa 6-fosfato isomerasa, 330F, 333F
en síntesis de sacarosa, 472F
glucosa 6-fosfato, 231
en glicólisis, 375
en gluconeogénesis, 359F, 361-362
en la ruta de la pentosa fosfato, 366-369F
en síntesis de la sacarosa, 472F
energía libre estándar de, 315T
estructura de, 232F, 330F
función metabólica en el hígado, 346

inhibición de la glucógeno fosforilasa por, 373
regulación recíproca mediante glucógeno fosforilasa y glucógeno sintasa y, 374
glucosamina (GlcN), 231T, 232F
glucósido de vainillina, 236
estructura de, 236F
glucósido hidrolasas, 178-181F
glucósidos, 234-236F. *Ver también* disacáridos; polisacáridos
disacáridos, 222, 234-236F
N-glucósidos, 236F
polisacáridos, 222, 237T-241F
glucosilfosfatidilinositol, proteínas ancladas a lípidos y, 277F
glucuronato (GlcA), 233F
glutamato, 60F, 61, 65, 72, 73F, 131F, 132, 163T, 314-315F
como transportador de nitrógeno, 524
conversión a prolina y arginina, 530F
en el catabolismo de aminoácidos, 539-540
en el ciclo de la urea, 549F, 550, 551, 552F, 553F
en lanzadera malato-aspartato, 438F
en reacciones transaminasa, 525F
degradación de, 541
síntesis a partir del amoniaco, 523-524F
síntesis de, 528
glutamato de monosódico (MSG), 60
glutamato deshidrogenasa, 539
en el ciclo de la urea, 551, 552F, 553F
glutamato sintasa, 524-525F
glutamato γ-semialdehído, 528, 530F
en degradación de aminoácidos, 541F
γ-glutamilo fosfato, 314, 558
glutamina, 60F, 132, 524F, 534T
en el catabolismo de aminoácidos, 540
en el ciclo de la urea, 549
en síntesis de nucleótidos de pirimidina, 563-566F
degradación de, 541
metabolismo en riñones, 554
síntesis de, 314-315, 528
glutamina-PRPP amidotransferasa, 558, 560F, 562, 563F
glutamina-sintetasa, 520F
en síntesis de glutamina, 524-525F
mecanismo de reacción, 38, 132F
regulación en *E. coli*, 524
G_{M2}, estructura de, 263F
GMP (guanosina 5'-monofosfato, guanilato), 312
en catabolismo de purinas 574, 576
en procesamiento del ARNm, 675F
en recuperación de la purina, 573-574F
interconversión de, 574F
síntesis a partir del IMP, 561-562F
síntesis del, 561-563F
Goodsell, David S., 22
gota, 576
gradiente de concentración de iones, transporte activo secundario y, 282
gradiente de concentración protónica
como fuente de energía para transporte activo, 423, 426, 435-436
energía de, 418, 419
estructura de, 419F
gradiente de pH, 421. *Ver también* gradiente de concentración de protones
gradiente del ion sodio, 282-283F
gráfica de Lineweaver-Burk (gráfica del doble-recíproco), 141F, 145-146F
gráfica de representación del doble recíproco (diagrama Lineweaver-Burk), 141F, 145-146F
grana, 461-462F
gránulo, 21F
grasas. *Ver* triacilgliceroles
Greenberg, G. Robert, 558, 559
GroE, 113, 114F
grupo ε-amino, 164T
grupo alquilo, 5F
grupo amino, 5F
grupo fosforil γ, 196
grupo guanidina, 65F
grupo peptídico, conformación de, 90-92F
grupo sulfhidrilo (tiol), 5F
grupo α-amino, 62, 64-65
en enlaces peptídicos, 66F, 67
grupo γ-carboxilo, ionización del, 65F
grupos acilo
ácidos grasos y, 256-258
transferencia de, 317
grupos alcoholes, en cadenas laterales, 59F
grupos funcionales, 4, 5F
grupos hemo
citocromos, 217F
de catalasa, 193
en metaloenzimas, 193
grupos peptídicos planares, 90F
grupos prostéticos, 194
fosfopanteteína, 202F
hemo, 116-117F
piridoxal fosfato como, 203-204
grupos R ácidos, 60F
grupos R alifáticos, 57-58F
grupos R aromáticos, 58F
grupos R básicos, 59-60F
grupos R con contenido de azufre, 59F
GSH. *Ver* glutatión
GTP (guanosina trifosfato), 311, 651
como transductores de señal, 285-287F
en alargamiento de cadena, 699-700, 701F, 702F
en la iniciación traduccional, 697
estructura de, 286F
succinil CoA y, 399-400
guanasa, 576-577F
guanidina, 164T
guanilato cinasa, 561
guanilato. *Ver* GMP
guanilil ciclasa, 537
guanililtransferasa, 674, 675F
guanina (2-amino-6-oxopurina), 9, 585-586
en catabolismo de la purina, 574-577F
en puentes de hidrógeno, 35F
en recuperación de la purina, 573-574F
estructura de, 559F, 585F
tautómeros, 586F
guanosina, 587
en el catabolismo de la purina, 574-575
en la recuperación de la purina, 573F, 574F
estructura de, 236F
estructura química, 587F
guanosina 5'-difosfato. *Ver* GDP
guanosina 5'-monofosfato. *Ver* GMP
guanosina 5'-trifosfato. *Ver* GTP
gulosa, estructura de la, 224F
H (entalpía), 13
*Hae*III, 609T
Haemophilus Influenzae, 737
Haldane, J. B. S., 136
Harden, Arthur, 329
Haworth, Norman, 227, 228
Hb. *Ver* hemoglobina
hebra antiparalela, 592-595F
hebra codificante, 653
hebra templada, 653
hebras líderes, 622-623F, 624F, 626, 627-629F, 630, 631T
hebras retrasadas, 360-361 630, 631T
síntesis del, 622-623F, 624F, 625F, 626-628F, 629F
hebras β, 95-97F
helicasas, 626, 628F. *Ver también helicasas específicas*
hélice 3.6_{13}. *Ver* hélice α
hélice anfipática, 95F
hélice α (3.6_{13} hélice), 92-95F
en colágena, 115
hélices α, 668, 670, 671F
hemiacetal, 227F, 236
hemo, 116-117F
de citocromos, 217F
estructura del, 116F
glicina como precursor de, 537F
síntesis de globina y, 707-708F
unión del oxígeno a, 118-119
hemoglobina (Hb), 53, 86, 92
como amortiguador, 49
como proteína alostérica, 121-123F
desórdenes genéticos de, 739
estructura del, 116-118F
regulación alostérica del, 153F
unión de oxígeno a, 118-123F
y transporte de dióxido de carbono, 123
Henseleit, Kurt, 549
heptanol, 31T
heteroglicanos, 237
HETPP. *Ver* hidroxietiltiamina
hexocinasa
en glicólisis, 330F, 332-333F, 343, 344, 352F
mecanismo de reacción, 174-175F
regulación de, 346-347
hexosas, 224, 231T
HGPRT, 105, 106F
hialectanos, 243
hidratación
en β-oxidación, 499-500F
hidrato covalente, 177F
hidrocloruro de donepezil (Aricept), 129F
hidrofobicidad, 33
de cadenas laterales de aminoácidos, 60-61
hidrogenasa, 439-440F
hidrógeno, 3
radio de van der Waals, 35T
hidrolasas, 131
hidrólisis, 37F
de ácidos nucleicos, 605F-610F
alcalina, 605-606F
EcoRI y, 610F
por endonucleasas de restricción, 608-610F
ribonucleasa catalizada, 605-606
de proteína, 539F
hidrólisis alcalina, de ARN, 493F-494
hidrólisis de amida, 178F
hidrólisis lisosómica, 538
hidropatía, 60-61T
hidroperóxido, 488-489F
3-hidroxiacil CoA, 499F-500
3-hidroxi-2-metilglutaril CoA (HMG CoA), 494-495F, 514-515F
6-hidroxi-1,6-dihidropurina ribonucleósido, 177F
4-hidroxifenilpiruvato, 532F, 533
5-hidroxilisina, 116F
hidróxido de sodio, 41F
hidroxilo, 5F
hidroximetilo, 164T
hielo, 28-29F

hierro, 3
como cofactor, 193
en hemo, 118-119F
metaloenzimas y, 193
hierro ferroso, unión del oxígeno al grupo hemo y, 118-119F
hígado
eliminación del amoniaco y, 551
fosfofructocinasa-2 actividad y, 348
función en el mantenimiento de los niveles de glucosa, 379-381F
función metabólica, 346-347
metabolismo del glucógeno en, 371, 374, 375, 376F
*Hind*III, 609T
hipérbola rectangular, ecuación para, 136
hipercolesterolemia familiar, 512
hiperglicinemia no cetónica, 548
hipervitaminosis, 194
hipótesis de señal, 712-716F
hipoxantina (6-oxopurina)
en el catabolismo de purinas, 574-576F
en la recuperación de purinas, 573-574F
hipoxantina, 576F
hipoxantina-guanina fosforribosilo transferasa (HGPRT), 106F
en recuperación de purinas, 573-574F
His-57, 184-187F
His-95, 168F
histamina, 61F
histidina (imidazolalanina)
cadena lateral, 164
degradación de, 541-542F
derivados de, 59
función catalítica del, 163T, 164, 165, 166F
ionización de, 63-64F
PRPP y, 558
requerimiento energético para la síntesis, 534T
síntesis de, 535-536F
histona acetiltransferasas (HATS), 601
histonas, 600, 610
acetilación y desacetilación de, 601
residuos básicos y ácidos, 600T
HMG-CoA, 495
HMG-CoA liasa, 514-515F
HMG-CoA reductasa, 494-495F
HMG-CoA sintasa, 495F, 514-515F
Hodgkin, Dorothy Crowfoot, 88F
hoja plegada. *Ver* lámina β
hojas β (hoja plegada), 86F, 91, 95-97F
hojillas, 273, 274F, 275F
Holliday, Robin, 639
holoenzima, 194
holoenzima ADN polimerasa III, 618T, 624, 626
holoenzima polimerasa ARN, 654, 655, 656, 657F, 669F
homeostasia de la glucosa, 379-380F
homocisteína, 61, 211F, 527-528F, 531F, 545F
homogentisato, 547F
homogentisato dioxigenasa, 548
homoglicanos (homopolisacáridos), 237
homopolisacáridos (homoglicanos), 237
homoserina, 61, 527-528F
Hoppe-Seyler, Felix, 583-584
hormona juvenil I, 267F
hormonas, 67
almacenamiento y movilización de ácidos grasos y, 507
en la ruta de señalización del adenilil ciclasa, 287-288
función en el mantenimiento de los niveles de glucosa, 379
glucoproteínas como, 249
oxidación de ácidos grasos y, 507-508
proteínas como, 53
regulación del metabolismo del glucógeno por, 375, 376F
transducción de señal y, 284
hormonas esteroides, 264
horquilla (brazo en horquilla), en ARN, 658, 710-711F
horquilla de replicación, 621, 622F
ADN polimerasa III, unión a, 621, 622F
en células eucariotas, 616, 617F, 630-633
síntesis de hebras delanteras y rezagadas en, 629F
*Hpa*II, 609T
HPLC (cromatografía líquida de alta presión), 69 HS-ACP, 481F
HS-CoA (coenzima A), 195T, 201-202F
HS-CoA, función en el metabolismo del piruvato, 388F
HSP70, 113, 114, 131, 704
I. *Ver* IMP
icosanoato (araquidato), 255T, 488-489F
idosa, 224F
IF (factores de iniciación), 696-697
IF-1, 696-698F
IF-2, 696-699
IF-3, 696-698F
imidazol, 44F, 63, 164T, 165
imidazol alanina. *Ver* histidina
imidazol glicerol fosfato, 535-536F
imidazolio, 165
IMP (I, inosina 5'-monofosfato, inosinato), 673F
en el catabolismo de las purinas, 575, 576
en el metabolismo de nucleótidos de purina, 558-560F
en recuperación de purinas, 573-574F
en síntesis de nucleótidos de pirimidina, 566
estructura de, 559F
interconversión de, 574F
síntesis de, 558-560F
inactivación de inserción, 727
inanición
cetogénesis y, 515
niveles de glucosa en mamíferos y, 379-381F
iniciador ARNt, 695
índice de empacamiento, 600
indol glicerol fosfato, 534, 535F
indol, 534-535F
indolalanina. *Ver* triptófano
inducción hormonal, 360
inductor, estructura de, 433F
inductores, 665
ingeniería genética. *Ver también* tecnología ADN recombinante
de plantas, 737, 738F
en procariotas, 737-739
Ingram, Vernon, 647
inhibición. *Ver también* regulación
acompetitiva, 144F, 145F
competitiva, 143T-145F
irreversible, 147-148F
no competitiva, 144F, 146F
reversible, 142-147
inhibición competitiva clásica, 143, 144F
inhibición competitiva no clásica, 143, 144F
inhibidores alostéricos, 152
inhibición competitiva, 143T-145F
inhibición de retroalimentación, 302
en síntesis de nucleótidos de purina, 562-563F
inhibición enzimática
irreversible, 147-148F
usos de, 146-147F
inhibición enzimática irreversible, 147-148F
inhibición enzimática reversible, 142T-147F
inhibición no competitiva, 144F, 145F
inhibición no competitiva, 144F, 146
enzimas reguladoras y, 152
inhibición reversible 142-147
acompetitiva, 145F
competitiva, 143T-145F
no competitiva, 146F
inhibidor, 142-143
inhibidor-1, 379
inhibidor alostérico, 149, 302
inhibidor controlado por hemo (HCI), 708F
inhibidores irreversibles, 143
inhibidores organofosforados, 147
inmunoglobulina clase G (IgG), 123, 124F
inmunoglobulinas. *Ver* anticuerpos
inosina, 177F
en el catabolismo de purinas, 574-575
en recuperación de purinas, 573F, 574F
inosina 5'-monofosfato. *Ver* IMP
inosinato. *Ver* IMP
inositol 1,4,5-*tris*fosfato (IP_3), 288-289F
insulina, 88F, 357F
a partir de genes clonados, 739
almacenamiento y movilización de ácidos grasos y, 507
cetogénesis y, 515
composición de aminoácidos, 72T
en gluconeogénesis, 360
epinefrina y, 375, 376F
función en el metabolismo de carbohidratos y lípidos, 515
mantenimiento de los niveles de glucosa y, 380
oxidación de ácidos grasos y, 507
regulación del transporte de la glucosa por, 344-346F
secuencia de, 77
interacciones alostéricas, 121
interacciones carga-carga, 34, 36F
como fuerzas de unión en reacciones enzimáticas, 171
en doble hélice, 596
plegamiento de proteínas y, 112
interacciones de apilamiento, 36
en doble hélice, 593F, 595
interacciones electrostáticas. *Ver* interacciones carga-carga; enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, fuerzas van der Waals
interacciones hidrofóbicas, 36F, 97F, 98
como fuerzas de unión en reacciones enzimáticas, 172
interacciones no covalentes, 33-36F
intercambio de hebras, 640-641F
interferones, 708, 739
interleucinas, 739
intermediarios, en reacciones, 161F, 165
intermedio enediol, 369F
International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB), 53, 131
International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), 53, 255T, 256F
intolerancia a la lactosa, 352
intrones, 17
definición, 677
eliminación en precursores de los ARNm, 678F
invasión de hebras, 639, 640F, 641F
ion alquilamonio, 59
ion amonio, 42, 43T, 44
ion bicarbonato, 43T
ion carbonio (carbocatión), 160
ion carboxilato, 65F
ion dihidrógeno fosfato, 43T

ion fosfato de monohidrógeno, 43T
ion guanidinio, 65F
ion imidazolio, 44F, 59, 63-64F
ion metilamonio, 43T, 44
iones activadores, 192F
iones dipolares (zwitteriones), 54, 65
iones esenciales, 192F
iones hidronio, 37-38
iones hidróxido, 37-38
ionización
  de aminoácidos, 62F-66T
  del agua, 37-39
isocitrato deshidrogenasa
  en ciclo del ácido cítrico, 398-399
  regulación del ciclo del ácido cítrico y, 405
isocitrato liasa, 408F
isocitrato, en el ciclo glioxilato, 407-410F
isoleucina, 54, 57-58F
  degradación de, 543-544F
  estereoisómeros, 58F
  requerimiento energético para la síntesis, 534T
  síntesis de, 528-529F
  unión isoleucil-ARNt sintetasa, 692F
isomerasas, 132
isopentenil pirofosfato
  conversión a escualeno, 496, 498F
  formación a partir del acetil-CoA, 496, 498F
N^6-isopenteniladenilato, 673F
isopreno, 495, 496
  estructura de, 264F
isoprenoides, 254F, 264F. *Ver también* vitaminas lípidas; esteroides; terpenos
  estructuras de, 267F
  síntesis a partir del colesterol, 496
isozimas, 332
jabones. *Ver* detergentes
Jacob, François, 648, 649
Jencks, William P., 172
Johnson, W. A., 385
K_a (constante de disociación ácido), 42-44F
K_{asoc}
  α-cetoácido, 206F, 207, 539
  α-queratina, 85, 92
  cetimina, 206F
  en ciclo glucosa-alanina, 553F
  en degradación de aminoácidos, 544F
  hemicetal, 227F
  kb (kilopares de bases), 595
  K_{cat} (constante catalítica, número de recambio), 138F, 139F, 140T
  Kendrew, John C., 3, 88
  K_{eq} *Ver* constante de equilibrio, 13, 309
  K_i (constante de inhibición), 143
  K_m (constante de Michaelis), 136-141F, 173, 174
  K_m (K_m aparente), 143T
  K_{tr} (concentración de sustrato), 281F
  K_w (producto iónico del agua), 39
  para la unión del represor *lac* a O, 621
  para polimerasa central, 656
  reacciones transaminasa y, 524-525F
k_{cat}/K_m (constante de especificidad),
Khorana, H. Gobind, 684
Kilopares de bases (kb), 595
K_m aparente, 151
Knowles, Jeremy, 169
Kornberg, Arthur, 615, 618, 624
Koshland, Daniel, 174
KpnI, 609T
Krebs, Hans, 385, 549
a-L-fucosa, 232F
lactato, 43T, 44,131, 199-200F
  como precursor gluconeogénico, 362-364
  en el ciclo glucosa-alanina, 553F
  reducción del piruvato para formar, 341F, 342-343
  regulación de la gluconeogénesis y, 365-366F
  transporte del oxaloacetato y, 364
lactato deshidrogenasa, 101F, 131, 138, 199-200F
lactosa (β-D-galactopiranosil-(1→4)-D-glucosa, galactosilglucosa), 235F, 236
  alolactosa a partir de, 667F
  estructura de, 666F
lamelas del grana, 462F
lamelas estromales, 462F
lámina β antiparalela, 96F, 97F, 124F
lámina β paralela, 96F
lanosterol, 496, 498F
lanzadera de malato-aspartato, 404, 437-438F
lanzadera del glicerol fosfato, 437F
laurato (dodecanoato), 255T, 256F
laurílos ésteres, 258
lazo radical. *Ver* horquilla, en ARN
leghemoglobina, 522
Lesch, Michael, 576
leucemia linfoblástica aguda, 526
leucina, 73
  degradación de, 543-544F
  estructura de, 57F
  requerimiento energético para síntesis, 534T
  síntesis de, 528-529F
leucodistrofia metacromática, 493
leucotrieno A_4, 489F
leucotrieno D_4, 266F, 267
leucotrienos, 488-490F
Levinthal, Cyrus, 112
LHC (complejos recolectores de luz de la clorofila *a/b*), 463
liasas, 131, 132
librerías de ADN. *Ver* ADN bibliotecas
ligador, 723
ligandos, 105
ligasas, 132
limoneno, 267F
linoleato, 258, 485, 489, 504
linolenato, 255T, 256, 257F, 258
linoleoíl-CoA, 484-485F
  oxidación del, 504-505F
γ-linoleoíl-CoA, 484
lipasa pancreática, 258, 509F
lipasa, regulación de la oxidación de ácidos grasos y, 507
lipasas, 512
lípidos, 10-11F, 253-276. *Ver también* ácidos grasos; membranas
  absorción de lípidos en los alimentos, 509-510F
  difusión de, 271-273F
  digestión de, 509-510
  diversidad estructural y funcional, 253-254F
  en membranas, 23, 269-271
  organización de, 254F
  sitios de síntesis, 498-499
  técnicas de estudio, 268F
  triacilgliceroles. *Ver* triacilgliceroles
  uniones, 4
  y fluidez de membrana, 273
lípidos del éter, síntesis de, 490-491F
lipoamida, 195T, 212F
  en el metabolismo de los piruvatos, 386-389F
  en la degradación de aminoácidos, 542
lipo-oligosacáridos, 243F
lipoproteínas, 258, 510F-513T
  de alta densidad (HDLs), 511F, 512T
  de baja densidad (LDLs), 511F, 512T
  de densidad intermedia (IDLs), 511F, 512T
  en el plasma humano, 512T
  estructura de, 511F
  metabolismo de, 511F
lipoproteínas de alta densidad (HDLs), 511F, 512T
lipoproteínas de baja densidad (LDLs), 511F, 512T
lipoproteínas de densidad intermedia (IDLs), 511F, 512T
lipoproteínas de muy baja densidad (VLDLs), 511F-512T
liposomas, 275
lisina, 527-528F
  degradación de, 548-549F
  estructura de, 59-60F, 527F
  función catalítica de, 163T
  hidroxilación de, 145
  requerimiento energético para la síntesis, 534T
  síntesis de, 527-528F
  transaminación de, 206F
lisofosfoglicérido, 510F
lisosomas, 19F, 284, 506
  en metabolismo de lipoproteínas, 493
  transporte de proteínas y, 712, 716
lisozima, 7F
  composición de aminoácidos, 72T
  constante de velocidad, 140T
  enlace iónico intermedio y, 179-181F
  mecanismo de reacción, 21
  unión de anticuerpos, 124F
lixosa, 224F
lóbulos (dominios), 87, 100-104F
Lovastatin, 494
lumen, 20, 459, 462-463F, 464F
  transporte de proteínas en, 712-713F, 715-716F
luz ultravioleta
  aminoácidos aromáticos y, 58
  conversión a CTP, 568F
  interconversiones de, 575F
  medición de desnaturalización del ADN por medio de, 596F
  síntesis de, 564-566F
  y fotodimerización, 635F
MacLeod, Colin, 3, 583
macromoléculas, 5-11
  ácidos nucleicos, 9-10
  biosíntesis de, 37
  estructura de, 6F
  hidrólisis de, 37F
  interacciones no covalentes en, 33-36F
  lípidos, 10-11F
  membranas, 10-11F
  polisacáridos, 7-8
  proteínas 6-7F
magnesio, 3
  ATP y, 311F
  cinasas y, 193
  como un cofactor, 193
  enolasa y, 340
malato
  en CAM, 474-476F
  en ciclo de ácido cítrico, 402
  en ciclo del glioxilato, 408-409F
  en el ciclo de la urea, 550
  en gluconeogénesis, 363
  en síntesis de ácidos grasos, 482
malato deshidrogenasa citosólica, 438F
malato deshidrogenasa, 101F, 199

en el ciclo de la urea, 550
en el ciclo del glioxilato, 407-409F
en síntesis del ácido cítrico, 402
malato deshidrogensa mitocondrial, 438F
malato sintasa, 407-409F
malonato
complejo succinato deshidrogenasa y, 401
estructura del, 401F
malonil CoA: ACP transacilasa, 481F
malonil-ACP, 481-484F
malonil-CoA, 480-484F
en síntesis de ácidos grasos, 480-481F
etapas en la síntesis de ácidos grasos a partir de, 480-484F
regulación de oxidación de ácidos grasos y, 501
maltosa (α-D-glucopiranosil-(1→4)-D-glucosa), 235F
a partir del almidón, 472
mamíferos
componentes del complejo piruvato deshidrogenasa, 390
difusión de lípidos de membrana en, 271-272
en síntesis de nucleótidos de pirimidina, 566
mantenimiento de los niveles de glucosa en, 379-381F
síntesis de ácidos grasos y oxidación en, 480
Man. *Ver* manosa
mandelato racemasa, 140T
manosa (Man)
abreviatura, 231T
en glicólisis, 352F
en glicoproteínas, 245
estructura de, 224F
mapa de restricción, 610-611F
máquina de proteínas, 23. *Ver también* complejo ATP sintasa; centro de reacción fotosintética; modelo del replisoma
marcadores de afinidad (reactivos dirigidos al sitio activo), 147
marcadores moleculares, carbohidratos como, 249
marco de lectura, 684, 685F
en molécula de ARNm, 695
margarina, 256
masa molar, 6
masa molecular relativa, 6
matrices de intercambio de aniones, 69
matriz/matrices
mitocondrial, 417F, 418
técnicas cromatográficas clasificadas por, 69
tipos de, 69
Matthaei, J. Heinrich, 684
McCarty, Maclyn, 3, 583
mecanicistas, 130
mecanismo de cambio de enlace, 433-434F
mecanismo de enzima sustituida, 142F. *Ver también* cinética de ping-pong
mecanismos cinéticos, 142
medicamentos contra el cáncer, 572F
medicamentos inhibidores, 324
medicina forense, 739, 741
membrana externa, 17F
membrana plasmática, 16, 17F, 19F
membrana tilacoide (lamela tilacoide), 21F, 459, 460-464F
membranas, 10-11F, 270-292
bicapas lipídicas, 269-270F
clases de proteínas de membrana, 274-278
colesterol en, 270, 273-274
composición de, 268-271F
funciones de, 267-269
glicerofosfolípidos, 259-261F
hojillas de, 273, 274F, 275F
lípidos en, 253
mitocondrial, 417F, 418
modelo de mosaico fluido, 270-271
proteínas en, 86
transducción de señal a través de, 284-292F
proteínas G, 285-290
receptores tirosina cinasas, 291-292F
ruta de señalización de adenilil ciclasa, 287
ruta de señalización de inositol-fosfolípido, 288-290F
transporte de ATP, ADP, y P_i a través de, 435-436
transporte de membrana, 278-284
características de, 278T
endocitosis y exocitosis, 283-284F
poros y canales, 280F
transporte activo, 278T, 281-283F
transporte pasivo, 281F
transporte de proteínas, 712-716F
membranas biológicas. *Ver* membranas
menaquinona (MQ), estructura de, 440F
Menten, Maud, 136
mercaptoalanina. *Ver* cisteína
2-mercaptoetanol, 75F, 108, 109F
2-mercaptoetilamina, 201-202F
Meselson, Matthew, 615
metabolismo, 12, 296-324. *Ver también* rutas metabólicas específicas
compartimentación de, 306-307
definición de, 296
flujo de energía en, 300-301F
generalidades de, 304-306F
interórgano, 306-307
métodos de estudio de, 323-324
regulación de enzima de, 148-149
regulación de, 301-303F
y transferencia del grupo acilo, 317
y transferencia del grupo nucleotidilo, 316-317
metabolismo aeróbico. *Ver* ciclo del ácido cítrico
metabolismo de aminoácidos, 520-556
apoptosis, 538
asimilación del amoniaco, 523-525F
catabolismo, 539
de las cadenas de carbono, 539-548F
ciclo de la urea, 549-553F
descripción de, 549F
reacciones auxiliares del, 550-553F
reacciones de, 549-550F
suministro de sustratos de balance para el, 553F
enfermedades del, 548
fijación del nitrógeno y ciclo del nitrógeno, 521-523F
metabolismo renal de glutamina, 553-554F
nitrógeno y, 520
reacciones de transaminación, 524-525F
recambio de proteínas, 538-539F
requerimientos energéticos del, 534T
síntesis de aminoácidos comunes, 526-532F
alanina, 528-529F
arginina, glutamato, glutamina y prolina, 528, 530F
asparagina y aspartato, 526-527F
cisteína, glicina y serina, 529-531F
tirosina, 531-532F
síntesis de los aminoácidos esenciales, 527-528, 531-536
aminoácidos aromáticos, 531-534F
histidina, 535-536F
lisina, metionina, treonina, aminoácidos de cadena ramificada, 527-528F
síntesis del óxido nítrico a partir de la arginina, 537F
metabolismo de carbohidratos, 357-381. *Ver también* fotosíntesis
degradación del glucógeno, 372-374
gluconeogénesis, 357, 358-362F
a partir del propionil-CoA, 504
comparado con la glicólisis, 365
descripción general de, 357
en inanición, 379-381
en la homeostasia de la glucosa, 379-380
precursores para, 362-364F
regulación de, 364-366F
y CAM, 475, 476F
homeostasis de la glucosa en mamíferos, 379-381F
fases de, 380-381
interconversiones catalizadas por transcetolasa y transaldolasa, 370F
metabolismo del glucógeno, regulación del, 371-374
por glucógeno fosforilasa y glucógeno sintasa, 371, 374
por hormonas, 375-376F
ruta de las pentosa fosfato, 366-370F
síntesis de glucógeno, 371-372F
metabolismo de la glutamina renal, 553-554F
metabolismo de nucleótidos, 557-582F
catabolismo de las pirimidinas, 579-580
catabolismo de purinas, 574-578F
ciclo de los nucleótidos de purina, 578F
reducción de ribonucleótidos, 569-570F
síntesis de CTP, 568F
síntesis de los nucleótidos de purina, 558-561F
a partir de IMP, 561-563F
inhibición de retroalimentación en, 562-563F
síntesis de nucleótidos de pirimidina, 563-567F
regulación de, 566-567F
síntesis del timidilato (dTMP), 570-573
recuperación de la purina y pirimidina, 573F-584
metabolismo del ácido crasuláceo (CAM), 474-476F
metabolismo entre órganos, 306-307
metabolismo intermediario, 296
metabolismo lípido, 479-519
ácidos grasos, 479-506F
β-oxidación de, 498-506F, 508, 513
elongación y desnaturalización de, 480F, 481, 482-483F
y absorción y movilización de, 509F-513T
almacenamiento de, 507-508
cuerpos cetónicos, 513-516F
diabetes y, 516
estructuras de, 513F
oxidación de, 515-516F
síntesis de, 514-515F
síntesis de, 480-485F
síntesis de eicosanoide, 488-490F
síntesis de esfingolípidos, 491-494F
síntesis de éter lipídicos, 490-491F
síntesis del colesterol, 495-498F
acetil-CoA a isopentenil pirofosfato en, 495-496
escualeno a colesterol, 496, 498F
isopentenil pirofosfato a escualeno en, 496, 497F
otros productos de, 496, 498F
síntesis del triacilglicerol y glicerofosfolípidos, 485-487F
metabolitos, 296
entrada y salida del ciclo del ácido cítrico, 407

metaloenzimas, 193
metanol, 217F, 234F, 268
  solubilidad en agua, 31T
metil α-D-glucopiranósido, 234F
metil β-D-glucopiranósido, 234F
N^6-metiladenilato, 673F
metilasa, 608-609F
3-metilcitidilato, 673F
5-metilcitidilato, 673F
metilcobalamina, 195T, 210-211F
5,10-metilenetetrahidrofolato, 209F, 210, 530F, 542
  en degradación de aminoácidos, 542
  en síntesis de dTMP, 571-573F
5-metiltetrahidrofolato, 209F, 211F, 528
7-metilguanilato, 673F
metilmalonil CoA, 211F, 504F
metilmalonil-CoA mutasa, 504F
metionil-ARNt sintetasa, 695
metionil-$ARNt_i^{MET}$, 695F, 708
metionina, 62
  degradación de, 545F
  estructura de, 59F
  iniciación de la traducción y, 695
  requerimiento energético para la síntesis, 64T
  síntesis de, 527-528
metotrexato, 572F
mevalonato, 494, 495F, 496
micelas, 33F
  sal biliar, 510
  vitaminas lipídicas y, 212
Michaelis, Leonor, 136
microfilamentos (filamentos de actina), 22F
microheterogeneidad, 245
microscopia electrónica de criofractura, 273, 274F
microtúbulos, 22F
Miescher, Friedrich, 583-584
migración de ramas, 641-42F, 643F
mioglobina (Mb), 53, 88
  estructura de, 116-118F
  unión de oxígeno a, 118-123F
mio-inositol, 233F
miristato (tetradecanoato), 255T, 256
Mitchell, Peter, 418-419, 447
mitocondrio, 19F, 20F-21, 416-418F
  β-oxidación en, 500
  entrada del piruvato en, 390-391
  estructura de, 417F
  fosforilación oxidativa en, 416-418F
  oxidación de cuerpos cetónicos en, 515-516F
  reacciones del ciclo de la urea en, 550
  síntesis de lípidos en, 506
  transporte activo de ATP, ADP y P_i a través de la membrana, 435-436
  transporte de acil-CoA graso hacia, 499-500F
mitosis, 19, 53
modelo de esferas y barras, 9-10F
modelo de Holliday de recombinación general, 639-640F, 641, 642F, 643F
modelo de mosaico fluido, 271
modelo de relleno de espacios, 89F
modelo de Watson-Crick, 590
modelo del replisoma para la replicación de ADN, 626-629F
modelos de listón y caricatura, 89F
modificación cotraduccional, 712
modificación covalente, 149, 302
  de nucleótidos en el procesamiento de ARNt, 672, 673F
  mediante HMG-CoA reductasa, 515
  regulación de complejos piruvato deshidrogenasa por, 405
  regulación de la isocitrato deshidrogenasa por, 405F
  regulación enzimática por, 153-154F
modulación alostérica no covalente, 149
modulador alostérico, 121, 302
molaridad efectiva, 172
moléculas de ADN recombinante, 719-721F
  aplicaciones en enfermedades humanas, 739-740F
  bibliotecas de ADN, 728-732
    ADNc, 729-730F
    cribado, 730-732F
    genómico, 728-729
  caminata de cromosomas, 733F
  con contenido de células huésped, 727-728F
  definición, 719
  ingeniería genética
    de plantas, 737, 738F
    en procariotas, 737-739
  mutagénesis sitio-dirigida de ADN clonado, 743-744F
  probabilidad del recombinante deseado, 731, 732F
  proyecto genoma humano, 728
  reacción en cadena de la polimerasa (PCR), 741-743F
  sondas, 731-732F
  tecnología de ADN recombinante, 719-747
  uso de la expresión de la proteína, 734-735F
    en eucariotas, 734-735, 736F
    vectores de expresión procariota, 734, 735F
  vectores de clonación, 721-727F
    cromosomas artificiales de levadura, 724-727F
    vectores de lanzadera, 724, 726F
    vectores fago, 723-724, 725F
    vectores plásmidos, 723F
moléculas de ARNt isoaceptor, 688
molibdeno, 575
monoacilglicerol 3-fosfato, 486F-487
2-monoacilglicerol, 509F
Monod, Jacques, 648
3′, 5′-monofosfato cíclico de adenosina. *Ver* cAMP
3′, 5′-monofosfato cíclico de guanosina. *Ver* cGMP
monosacáridos, 7, 222, 223-234F. *Ver también* carbohidratos,
  abreviaturas para, 231T
  ciclación de, 226-229F
  como azúcares reductoras, 236
  conformaciones de, 229-231F
  definición de, 7, 222
  derivados de, 231-234F
  estructuras de, 223-225F
  quiralidad de, 223-226F
motivo estructural (estructura supersecundaria), 99-100F
motivos $\beta\alpha\beta\alpha$, 199
mucinas, 247
músculo, 85
  ciclo de nucleótidos de purina en, 578F
  función del glucógeno en, 374, 375
  glicólisis en, 551
  metabolismo del glucógeno en, 376F
mutaciones
  de ADN, 634-635, 638
  estudio del metabolismo y, 323-324
mutaciones de línea germinal, 634
mutagénesis sitio-dirigida, 324, 743-744F
  en el estudio de rutas metabólicas, 169
  modificación enzimática mediante, 148
mutagénesis, sitio-dirigida. *Ver* mutagénesis sitio-dirigida
mycobacterium tuberculosis, genoma, 298
Na^+-K^+ ATPasa, transporte activo y, 282-283F
N-acetilgalactosamina (GalNAc)
  abreviatura, 231T
  en glucoproteínas, 246
  estructura de, 247F
N-acetilglucosamina (GlcNAc)
  abreviatura, 231T
  conformaciones de, 179F
  en glucoproteínas, 244-245
  estructura de, 244F
N-acetilglutamato, 528
N-acetilmanosamina, 231
N-acilesfinganina (dihidroceramida), 492F
NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleótido), 192F, 195T, 197-200F, 318-319
  en ciclo del ácido cítrico, 398, 403-404
  en degradación de aminoácidos, 542
  en el metabolismo del piruvato, 386-389F
  en glicólisis, 336-337, 342
  en la replicación del ADN, 626-627F
  espectro de absorción ultravioleta de, 322
NADH (nicotinamida adenina dinucleótido reducida), 197, 198-199F
  de la reacción gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, 336
  en ciclo del ácido cítrico, 392F, 398e, 402, 403-404F
  en el metabolismo del piruvato, 386-390F
  en glicólisis, 342
  en oxidación de ácidos grasos, 498
  en reacciones de transporte de electrones, 424
  en síntesis del glutamato, 524
  espectro de absorción ultravioleta de, 322
  oxidación aeróbica de, cistosólico, 436-438F
  regulación del ciclo del ácido cítrico y, 404-406F
  transferencia de electrones de, 319, 322-323
NADH-ubiquinona oxidorreductasa (complejo I, NADH deshidrogenasa), 424-425F
  características, 423T
  energía libre estándar, 423T
  potenciales de reducción estándar, 423T
$NADP^+$ (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), 195T, 197-199F, 319
  en fotosíntesis, 464-466F
  síntesis de ácidos grasos y, 482-483F
NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida), 197, 198-199F, 319, 357, 418
  en fotosíntesis, 464-466F
  en ruta pentosa fosfato, 366-369F
  en síntesis del dUMP, 571-572F
  en síntesis del glutamato, 524F
  en síntesis del óxido nítrico, 537
  síntesis de ácidos grasos y, 482-483F
  síntesis de desoxirribonucleótido y, 569F
NADPH; oxidaciones biológicas del ubiquinol,
  en fotosíntesis, 445
  oxidaciones biológicas del, 318-323
  producción de ATP y, 403T-404F
NeuNAc. *Ver* ácido *N*-acetilneuramínico
neuraminidas del virus de la influeza tipo A, 96F
neurotransmisores, 284
N-formilmetionina, 695
N-formiminoglutamato, 541F
Nicolson, Garth L., 271
nicotinamida, 197F
nicotinamida mononucleótido (NMN), 197
Nirenberg, Marshall, 684
nitrogenasa, 521
nitrógeno, 3
  metabolismo de aminoácidos y, 520
  radio de van der Waals, 35T
  suministro de balance para el ciclo de la urea, 553F

nitroglicerina, 538
NMN (nicotinamida mononucleótido), 197, 198F
nomenclatura
  ácidos grasos, 255T-256F
  aminoácidos 53, 56
  bases, nucleótidos, nucleósidos, 589T
norepinefrina (noradrenalina), 61, 196, 375
*Not*I, 609T
N-término (amino término), 66-67, 73, 86
nucleasas, 605-10F. *Ver también* endonucleasas de restricción
núcleo de eucariotas, 18-19F
nucleófilo 159
  agua como, 36-37F
nucleoide, 604
nucleolo, 18
nucleósido difosfato cinasa, 561
2'-nucleósido monofosfato, 606F
3'-nucleósido monofosfato, 606F, 607F
2', 3'-nucleósido monofosfato cíclico, 605-606F
nucleósidos, 196, 236, 584, 586-587F. *Ver también* ADN; ácidos nucleicos; ARN; *y nucleósidos específicos*
  estructuras de, 587F
  nomenclatura, 589T
nucleósidos difosfatos, 588
nucleósidos trifosfatos, 306, 588. *Ver también* ATP
nucleosomas, 600-603F
  estructura de, 602F
nucléotido 2'-*O*-metilado, 673F
nucleótidos, 196, 587-589F. *Ver también* ADN; ARN; *nucleótidos específicos*
  estructuras de, 584F
  nomenclatura, 589T
  uniones, 4
  uniones 3'-5' fosfodiéster, 590-592F
nucleótidos de pirimidina
  interconversiones de, 574F
  síntesis de, 564-567F
    regulación de, 566-567F
nucléotidos de purina
  ciclo en músculo, 578F
  glicina como precursor de, 537F
  interconversión de, 574F
  síntesis de, 558-561F
    a partir de IMP, 562-563F
    inhibición de retroalimentación de, 561-563F
número de rotación (constante catalítica, K_{cat}), 138F, T, 139F, 140T
NusA, 656, 657F, 658, 659F, 663
Nyhan, William, 576
O_2, 416
O-acetilserina, 531F
O-acetilserina sulfhidrilasa (PLP), 531F
octámero de histonas, 601-602F
Ogston, Alexander, 397
Okazaki, Reiji, 623
Old Yellow enzima, 130
oleato (*cis*-Δ^9-octadecenoato), 255T, 256
  abundancia de, 258
  estructura de, 257F
  modelo de, 257F
oleoíl, 506
oligodeoxitimidilato (oligo dT), 729
oligómero, 105
oligopéptido, escisión y secuenciación de, 77F
oligosacáridos. *Ver también* carbohidratos; glucoproteínas
  descripción de, 222
  enlace-*N*, 246-248F
  enlace-*O*, 246-248F
  procesamiento, 248
oligosacáridos de alta manosa unidos por enlaces-*N*, 247-248F
oligosacáridos de cadena híbrida unidos por enlaces-*N*, 247-248F
oligosacáridos unidos por enlaces-*N*, 246-248F
OMP (orotidina 5'-monofosfato, orotidilato), 564-566F
OMP decarboxilasa, 564F, 566
operadores, 666
operón *fen*, 710
operón *his*, 710
operón *ile*, 710
operón *lac*, 665-669F
  activación de la proteína reguladora por cAMP, 668-670F
  bloqueo del represor *lac*, 665-667F
operón *leu*, 710
operón *thr*, 710, 711F
operón *trp*, regulación de, 708-711 F
operones, 652
  operón *lac*, 665-669F
orden cinético, 134
organelos, 18
organismos transgénicos, 735, 736F
*ori*C, 629F
orientación, de genes, 652-653F
origen de la replicación, 616, 617
ornitina, 530F, 566F
  en ciclo de la urea, 549, 550, 551F, 552F
  en degradación de aminoácidos, 541F
ornitina transcarbamoilasa, 550
orotato, 564-566
orotato fosforribosiltransferasa, 573
orotidina 5'-fosfato decarboxilasa, 140T
ósmosis, 31
osteomalacia, 213
oxalosuccinato, 398
β-oxidación, 499-501F
  de ácidos grasos en el hígado, 508
  de ácidos grasos no saturados y cadena impar, 504-506F
  generación de ATP a partir de, 502
  peroxisomal, 500
  reacciones de, 499-500F
  regulación de, 515
  sistema lanzadera de la carnitina y, 501, 503F
oxidación aeróbica, del NADH citosólico, 436-438F
oxidasas, 131
óxido nítrico, 537F
óxido nítrico sintasa, 537F
oxidorreductasas, 131
oxigenación
  de la hemoglobina, 118-119
  de mioglobina, 118-119
  de ribulosa 1, 5-*bi*fosfato, 469F
  definición de, 118
oxigenasas, 131
oxígeno, 3
  enlazamiento a la hemoglobina, 117, 118-123F
  enlazamiento a la mioglobina, 118-123F
  glicólisis y, 350
  potencial de reducción estándar de, 423T
  radio de van der Waals de, 35T
oxihemoglobina, 117F, 118
oximioglobina, 117F, 118. *Ver también* mioglobina
oxipurinol, 576F
2-oxo-4-aminopirimidina. *Ver* citosina
oxoloacetato, 207F, 362, 363, 364, 365F
oxoloacetato,
  en el ciclo de la urea, 549, 550, 551F, 552, 553F
  en el ciclo del ácido cítrico, 384-385, 391-393F
  en el ciclo glioxilato, 408-410F
  en lanzadera de malato-aspartato, 438F
  en reacciones de transaminasas, 526F
  en síntesis de ácidos grasos, 482
  gluconeogénesis y, 359F, 360, 407
  regulación de la gluconeogénesis y, 365F
  y reacciones anapleróticas, 407
P_{50} (presión de saturación media), 143
P680, 447F, 453, 455-456F, 458-459F
P700, 453, 455-456F, 458-459F
palindromos, 608
palmitato (hexadecanoato)
  abundancia de, 258
  en lípidos, 255T, 256
  fórmula molecular de, 256
  síntesis de, 482
palmitato de miricilo, 266F
palmitato de sodio, 32
palmitoíl, 492F
palmitoíl CoA, 484, 485, 491-492F
palmitoíl-ACP, 482
palmitoleato, 485
p-aminobenzoato, 531
Pandit, Upendra K., 172
pantotenato (vitamina B_5), 194T, 195T, 201-202F
papaína
  número de recambio de, 138T
  perfil de velocidad comparado con el pH, 166-167F
par de bases (pb), 592-593F
  en la replicación de ADN, 622
pared celular, 17F, 18, 19F, 243-244F
pares de bases de inosinato, 688F
partícula de reconocimiento de señal (SRP), 713-715F
paso limitante de la velocidad, 161
Pasteur, Louis, 329, 350
Pauling, Linus, 92, 95
pb (par de bases), 592-593F, 622
pBR322, 723F, 727, 738F
PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular), 621F, 631
PCR. *Ver* reacción en cadena de la polimerasa pdApdGpdTpdC, 591-592F
penicilina, 88, 244, 245F
pentaglicina, 244
pentanol, 31T
pentosas, 224, 231T
PEP carboxilasa. *Ver* fosfoenolpiruvato carboxilasa
PEP carboxiquinasa. *Ver* fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
pepsina, 130
peptidil transferasa
  en la formación del enlace peptídico y, 700-701F
  y puromicina, 707
peptidil-ARNt, 701-704F
peptidilhomoserina lactona, 76F
peptidilprolilo *cis*/*trans* isomerasas, 90, 102F
péptido de señal, 712-715F
péptido líder, 710-711F
peptidoglicanos, 243-244F
péptidos. *Ver* proteínas
pequeña ribonucleoproteína nuclear (snRMP), 678
pequeñas moléculas de ARN, 599, 648
pequeñas moléculas de ARN nuclear (snARN), 678
perclorato, 32
peroxidasas, 131

peróxido de hidrógeno, 138, 440, 575-576
peroxisomas, 19F, 21, 506
  β-oxidación en, 499, 500
Perutz, Max, 3, 88, 92
peso molecular, 6
peso molecular absoluto, 6
Ph *a* (feofitina *a*), 458F
pH, 39T-41F
  acidosis láctica y, 41
  actividad de la ribulosa 1, 5-*bi*fosfato carboxilasa-oxigenasa y, 467
  CAM y, 476
  definición, 40
  efecto sobre la hemoglobina, 49
  efecto sobre las velocidades enzimáticas de reacción, 166-167F
  fisiológico, 41
  fosfofructoquinasa-1, actividad de la, y, 348
  relación con pK_a, 42
  soluciones amortiguadas y, 46-49F
  y capacidad de amortiguamiento, 48
pH fisiológico, 41
p-hidroxibenzoato, 531
PHL P2, 97F
P_i. *Ver* fosfato, inorgánico
pigmentos accesorios, 447
pigmentos antena, 448F, 449, 452
pigmentos de par especial, 458F. *Ver también* P680; P700
pigmentos, fotosintéticos
  absorción y transferencia de la energía luminosa por, 446-447
  como componentes de fotosistemas, 449
  descripción de, 445-447
pilina, 103F
pirano, 227F
piranosas, 227, 228
piridoxal (vitamina B_6), 194T, 195T, 205F
piridoxal 5'-fosfato (PLP), 203-207F
  como coenzima, 195T
  en degradación de glucógeno, 373
  en reacciones de las transaminasas, 527-528F
  en síntesis del triptófano, 533, 534F
  estructura de, 205F
piridoxamina fosfato (PMP), 206F, 207
  en reacciones de las transaminasas, 525
piridoxamina, 205F
piridoxina, 205F
pirifosfatasa, 131F, 483, 690F
  en recuperación de la purina, 573
  en replicación del ADN, 619, 620F
pirimidinas, 9, 585-586F. *Ver también* nucleótidos de pirimidina
  catabolismo de, 573-574F, 580
  estructura de, 585F
  tautómeros, 586F
pirofosfato de geranil, 496-497F
pirofosfato de hidroxietiltiamina (HETPP), 203, 204F, 212
  en el metabolismo del piruvato, 386, 387, 388F
pirofosfato hexadecanoatopirofosfate hexadecanoato. *Ver* palmitato hexanol, 31T
pirofosfato inorgánico, (PP_i), 315T, 371
  en la recuperación de la purina, 573F
  en síntesis de glucógeno, 371
  energía libre estándar de hidrólisis para, 315T
  hidrólisis de, en síntesis de ARN, 650, 651F
pirofosfomevalonato decarboxilasa, 495F
pirofosfomevalonato, 495F
pirrolina 5-carbonato, en degradación de aminoácidos, 541F
piruvato, 131F
  ciclo del sustrato y, 365F
  conversión en acetil-CoA, 385-391F
  destino de, 340-343
  en ciclo de la glucosa-alanina, 552-553F
  en gluconeogénesis, 358-360F
  en la síntesis de la valina y leucina, 528-529F
  entrada al mitocondrio, 390-391
  estructura de, 331F
  interconversión con lactato, 199, 200F
  mitocondrial, 363, 364F
  síntesis a partir de la cisteína, 546F
  transporte oxoloacetato y, 364
piruvato carboxilasa
  en gluconeogénesis, 359-360F
  y reacción anaplerótica, 407
piruvato cinasa, 100F
  en glicólisis, 331F, 340F, 344
  regulación de, 348-350F
piruvato decarboxilasa, 132F
  en síntesis del etanol, 341
  reacción, participación del TPP en, 203, 204F
piruvato deshidrogenasa cinasa, 154F, 405
piruvato deshidrogenasa fosfatasa, 154F, 405
piruvato deshidrogenasa, 154F
  en metabolismo del piruvato, 386F
pK_a
  de ácidos grasos, 254
  de aminoácidos, 62F-66T
  de grupos ionizables de aminoácidos, 164T
  definición de, 42
  y capacidad amortiguadora, 46
plantas, ingeniería genética de, 737, 738F
plasmalógenos, 491
  a partir de éteres de alquilo, 491F
  en organización lípida, 254F
  estructura de, 262F
plásmido Ti, 737, 738F
plastocianina, 455
plastoquinol. *Ver* plastoquinona
plastoquinona (PQ/PQ_2)
  como coenzima, 214, 215F
  efecto de condiciones luminosas en, 455-456F
  en fotosíntesis, 455-456F
  estructura de, 215F
  isopentenil pirofosfato como precursor de, 498
  reducción a plastoquinol, 458F
plegamiento de inmunoglobulinas, 123, 124F
plegamiento del dominio de barril a/b, 102F
plegamiento, ARN, 599
plegamientos de dominio, 104F
pliegue de dominio de lámina paralela torcida, 103F, 104F
PLP. *Ver* piridoxal 5'-fosfato
p-nitroanalina, 178F
polaridad, 27F
poli A, 729, 730F, 731
poli A polimerasa, 674, 676F
poliadenilación, 674, 676F, 677F
poliligador, 722
polimerasa de partícula central, 655
polímeros. *Ver* biopolímeros
polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs), 739, 740F
polinucleótido, 9
poliol deshidrogenasa, 366
polipéptidos, 6. *Ver también* proteínas
polirribosoma (polisoma), 699
polisacáridos, 7-8F, 178-179F, 222, 237T-241F. *Ver también* carbohidratos
  almidón y glucógeno, 237T-239F
  cadenas poliméricas de, 236
  celulosa y quitina, 239-241F
  clasificación de, 237
  estructura de, 237T, 238F
polisacáridos de almacenamiento, 237
polisacáridos estructurales, 237
polisoma (polirribosoma), 699
poliuridilato (poli U), 684
porfirinas
  glicina como precursor de, 537F
  y ciclo del ácido cítrico, 406F
porina, 280, 418
poros, 280F
posición de tambaleo, 688T-689F
potasio, 3
potencial de membrana (potencial eléctrico), 421
potencial de punto medio. *Ver* potencial de reducción estándar
potencial de reducción estándar, 423T
potencial de transferencia de grupo fosforilo, 315
potencial eléctrico. *Ver* potencial de membrana
potenciales de reducción
  cambio de energía libre y, 319F-321T
  estándar, 321T
pozo de energía, del plegamiento de proteínas, 110F
PP_i. *Ver* pirofosfato, PQ inorgánico. *Ver* plastoquinona
PQH_2. *Ver* plastoquinona
PRA (fosforribosilamina), 560F
prefenato deshidrogenasa, 532-533F
prefenato, 532F, 533, 534
prefijos, unidad SI, 25T
prenil transferasa, 496-497F
presión estándar, 308
presión osmótica, 31
primasa, 623, 626, 628F
  eucariota, 630
primosoma, 623, 626, 628F
procariotas 16, 17-18F
  desplazamiento en, 702, 704F
  factores de iniciación, 696-697F
  ingeniería genética en, 737-739F
  iniciación en, 696-697
  ribosomas, 692F
  transporte de membrana, 283
  vectores de expresión, 734-735F
  velocidad de transcripción, 699
procedimiento de degradación de Edman, 73, 75-77F
procesamiento del ARN, 674-680F
  adición de nucleótidos, 670
  definición, 670
  eliminación de nucleótidos, 670
  modificación covalente de bases, 670, 673F
procesamiento postranslacional, 712-716F. *Ver también* procesamiento de ARN
producto (P), 133
productos genéticos terapéuticos, 739
proelastasa, 182F
proenzimas. *Ver* zimógenos
prolina, 58F, 172
  cadenas laterales, 94
  degradación de, 541F
  requerimiento energético para la síntesis, 534T
  síntesis de, 528, 530F
promotores
  bloqueo de transcripción del operón *lac* y 668, 669, 670
  definición de, 652
  ensamblado de complejo de transcripción en, 652, 653-655
  reconocimiento por subunidad σ, 653, 655
  secuencia de nucleótido de, 653-654F

propanol, 31T
propionato, 363-364
propionil CoA, 364
  en degradación de aminoácidos de cadena ramificada, 544F
  conversión a succinil CoA, 504F
  conversión de la metionina en, 545F
  conversión de la treonina en, 543F
prostaciclina, 488-489F
prostaglandina E_2 (PGE_2), 266F
prostaglandina G_2 (PGG_2), 488-489F
prostaglandina H_2 (PGH_2), 488-489F
prostaglandinas, 266-267, 488-489F
proteasa aspártica del VIH-I, 106F
proteasa del VIH, 105, 106F
proteasas, 75-76
proteasoma, 539F
proteína activadora de catabolito (CAP), 669
proteína andamio-ARN, 604F
proteína canalizadora del potasio, 105, 106F
proteína cinasa A (proteína cinasa dependiente del cAMP)
  activación de, 288F
  en glicólisis, 349F
  y regulación de la gluconeogénesis, 365F
  y regulación del metabolismo del glucógeno, 375, 376F
proteína cinasa C, 289-290F, 375, 376F
proteína cinasa dependiente de cAMP. *Ver* proteína cinasa A
proteína cinasas, 153
  función reguladora, 303F
proteína de acoplamiento (proteína receptora SRP), 713
proteína de la cápsida MS2, 105, 106F
proteína de unión a la caja TATA (TBP), 661-662F
proteína de unión a una hebra simple (SSB), 626, 628F
proteína de unión al retinol, 102F
proteína de unión con cubierta (CBP), 697
proteína desestabilizante de hélices, 626. *Ver también* proteína de unión a la hebra sencilla
proteína disulfuro isomerasa (PDI), 109
proteína fibrosa, 85-86. *Ver también* colágena
proteína fosfatasa-1, 376-379F
proteína fosfatasas, 302
proteína oligomérica, ARN polimerasa como, 649-650
proteína portadora de acilo (ACP), 202F
  como una proteína de transferencia de grupo, 216
  síntesis de ácidos grasos y, 480-485F, 501F
proteína receptora SRP (proteína muelle), 713
proteína reguladora de cAMP (CRP), 668-770F
proteína transportadora de carboxibiotina, 481
proteína verde fluorescente, 102F
proteína-MoFe, 523
proteínas 6-7F. *Ver también* enzimas; polipéptidos
  clases de proteínas de membrana, 274-278F
  composición de aminoácidos de, 72T-73F
  conformación de, 84
  desnaturalización y renaturalización, 107-110F
  difusión en las proteínas de membrana, 272-273F
  en membranas, 11, 269, 270
  enlaces, 4
  enlaces peptídicos, 66-67F
  estrategias de secuenciación, 75-78F
  estructura cuaternarira, 104-106F
  estructura de, 3, 84-86
    conservación evolutiva de, 100-101
    métodos de determinación, 87-89F
    niveles de, 86-87F
    terciaria, 98-104F
  estructura primaria y relaciones evolutivas, 78-80F
  funciones biológicas de, 52-53
  glicosilación de, 716F
  globular, 85
  hebras β y hojas β, 95-97F
  hélice α, 92-95F
  hidrólisis de, 37F, 73F
  lazos y giros, 97-98F
  plegamiento y estabilidad de, 110-115F
    chaperonas y, 112-115F
    efecto hidrofóbico y, 110-111F
    interacciones de van der Waals e interacciones carga-carga y, 112
    unión de hidrógeno y, 111-112T
  recambio de, 538-539F
  representación de, 7
  técnicas de purificación, 67-69F
proteínas alostéricas, 121-123F
proteínas coenzimas (proteínas de transferencia de grupo), 215-216F
proteínas de golpe de calor, 113
proteínas de membrana ancladas por lípidos, 276-277F
proteínas de membrana periférica, 276
proteínas de unión al calcio, 99
proteínas G, 285-287F, 289
  ciclo de la proteína G, 286F
  G_q, en ruta de señalización inositol-fosfolípido, 288
  proteína G_i, 287
  proteína G_s, 287, 288F
proteínas globulares, 85. *Ver también* proteínas
proteínas integrales de membrana, 274-276
proteínas preniladas, 277
proteínas similares a las histonas, 604
proteínas unidas al nucleótido de guanina. *Ver* proteínas G
proteínas α, 287
proteínas β, 287
proteínas g, 285-287F
proteobacteria, 21
proteoglicanos, 241-243F
proteómica, 85
protoporfirina IX, 116-117
proyección de Fischer, 7, 8F
  proyecciones de Haworth, en comparación con la, 227, 228F
proyección de Haworth, 7, 8F, 227-228F
  de celulosa, 240F
proyecto del genoma humano, 728
PRPP sintetasa, 561-562
PRPP. *Ver* 5-fosforribosil 1-pirofosfato
pseudoheptulosa 1, 7-*bi*fosfatasa, 466F
psedoheptulosa 7-fosfato, 367F, 370F
  en ruta de la pentosa fosfato, 367F
  interconversiones catalizadas por transcetolasas/transaldolasas y, 704F, 705-707F
pseudo reacción de primer orden, 134
pseudouridilato, 673F, 686F, 687
PSI. *Ver* fotosistema I
psicosa, 225, 226F
PSII. *Ver* fotosistema II
*Pst*I, 609T
pterina, 208F, 575
PTP-1B, 516
puente salino, 34, 319
puentes de disulfuro, 59, 77
  en desnaturalización de proteínas, 108-109F
  rompimiento y bloqueo, 75F
puentes de hidrógeno, 34-35F
  como fuerzas de unión en reacciones enzimáticas, 172
  en ácidos nucleicos, 585-586
  en agua, 28-30F
  en colágena, 115F
  en doble hélice, 595, 596
  en hélice α, 94
  en láminas β, 95-96
  estabilización del estado de transición y, 176
  plegamiento de proteínas y, 111-112T
  sitios de unión en ácidos nucleicos, 587F
pulmones
  transporte de oxígeno de, 119F, 120, 123
  y regulación del pH sanguíneo, 48
punto de fusión
  de ácidos grasos, 255T, 256
  de ADN, 596
  de ceras, 266
  del hielo, 28-29
punto isoeléctrico, 63-64F
purina nucleósido fosforilasa, 147F
purinas, 9, 585-586. *Ver también* nucleótidos de purina
  catabolismo de, 574-578F
  estructura de, 585F
  tautómeros, 586F
  y degradación y recuperación de, 573-574F
puromicina, 707
Q (cociente masa acción), 309
Q. *Ver* ubiquinona
QH_2. *Ver* estructura cuaternaria de la ubiquinona
  de enzimas regulatorias, 153
  de proteínas, 86F, 87, 104-106F
quilomicrones, 511F, 512T
química
  mecanicista, 158-160
  orgánica, 4
química mecanicista, 158-160
química orgánica, 4
quimotripsina, 130
  constante de velocidad de, 140T
  especificidades de sustrato, 183-184
  mecanismo catalítico de, 176, 184-187F
  sintetizados y almacenados como zimógenos, 182F
α-quimotripsina, 182F
quimotripsinógeno, 182-183F
quinonas. *Ver* ubiquinona; plastiquinona
quiralidad
  de aminoácidos, 54
  de carbohidratos, 227F
  de lípidos, 258F
  de monosacáridos, 223-226F
quitina, 241F
  estructura de, 237T
racemasa, 504F
Racker, Efraim, 419
radicales libres, 160, 201
  reducción de ribonucleótidos y, 570
  vitamina E y, 213
radio de van der Waals, 35T
Ramachandran, G. N., 91F
raquitis, 213
reacción *bi*sustrato, 142F
reacción consecutiva ordenada, 142F
reacción de elongación de la cadena, 650-652F
reacción de segundo orden, 139, 167T
reacción de transferencia del grupo fosforilo, 332F
reacción de un solo paso, 161F
reacción en cadena de la polimerasa (PCR), 741-743F
  amplificación de ADN, 612
  usos médicos, 741

reacción glucógeno sintasa, 372
reacción iónica, 159
reacción secuencial aleatoria, 142F
reacciones anabólicas, 296-297F
reacciones anapleróticas, 407
reacciones bimoleculares, 172, 173F
reacciones bioquímicas
  espontáneas, 308
  in vivo comparado con in vitro, 4
reacciones bioquímicas, 2
reacciones catabólicas, 297F, 298, 300F
  NADH y NADPH y, 197-198F
reacciones cercanas al equilibrio, 309-310
reacciones de asociación, 167
reacciones de metilación, 196
  de fosfatidiletanolamina, 486F-487F
  de dUMP, 570-573F
  en procesamiento de ARNm, 674-675F
  endonucleasas de restricción y, 608-609F
reacciones de oxidación, 170
reacciones de oxidación-reducción, 160
reacciones de primer orden, 134
reacciones de ruptura, 160
reacciones de transaminación, 524-525F
reacciones de transferencia de grupo
  acilo, mecanismo general del, 159
  con ATP implicado, 196F
  función de las coenzimas, 196
  y catálisis covalente, 165-166F
  y transferasas, 131
reacciones enzimáticas, 130
reacciones enzimáticas, en el ciclo del ácido cítrico, 391T
reacciones espontáneas, 308
reacciones luminosas, 464. *Ver también* complejos recolectores de luz de la clorofila (LHCs), 463
reacciones metabólicamente irreversibles, 309
reacciones monomoleculares, 172
reacciones multisustrato
  cinética de, 141-142F
  efecto de proximidad y, 171
  inhibición de, 145
reacciones oscuras, de fotosíntesis, 444. *Ver también* ciclo reductivo de la pentosa fosfato
reacciones químicas, 15
reacciones secuenciales, 142F
reactivo de Edman, 73, 74F
reactivos de tiol, 108-109
reactivos dirigidos al sitio activo (marcadores de afinidad), 147
RecA, 131, 641F, 643
recambio, 298
receptor de insulina, 291-292F
receptor tirosina cinasas, 285, 291-292F
receptor α_1-adrenérgico, 375, 376F
receptor β-adrenérgico, 375, 376F
receptores adrenérgicos, 375, 376F
recombinación de ADN 639-643F. *Ver también* tecnología ADN recombinante
  como forma de reparación, 641F-643F
  en *E. coli*, 640-641F
  modelo de Holliday de, 639-640F
  recombinación general, 639-640F
  sitio específico, 639
  y proteínas Ruv, 642F
  y RecA, 641F, 643
  y RecBCD, 640-641
recombinación del ADN. *Ver* recombinación, ADN
recombinación génica. *Ver* recombinación, ADN
recombinación homóloga. *Ver* recombinación, ADN
recuperación, de purinas y pirimidinas, 573-574F
reducción de ribonucleótido, 569-570F
reductasas, 131
región líder, 709F, 710-711F
región nucleoide, 17F
región -35, 654F, 669
regiones hipervariables, 123-124
regulación. *Ver también* inhibición
  activación de prealimentación, 302
  alostérico, 152-154F
  de actividad enzimática, 148-154F
  inhibición de retroalimentación. *Ver* inhibición de retroalimentación
  por ciclos de sustrato, 364-365F
  por modificación covalente. *Ver* modificación covalente
  por transducción de señal. *Ver* transducción de señal
regulación alostérica, 152-154F
regulación de traducción, 705-706
reguladores locales, 508
Reichard, Peter, 569
relación de acción de masas (Q), 309
renaturalización, 108-109F
reparación del ADN, 634-639F
  ADN polimerasas y, 618, 634, 636-638F
  recombinación como forma de, 641-643
  reparación directa, 635, 636F
  reparación por escisión, 635-638F
reparación directa, 635, 636F
reparación por escisión, 635-639
reparación por escisión mediante endonucleasas, 636-637F
replicación bidireccional del ADN, 616-617F
replicación del ADN, 615-646. *Ver también* reparación del ADN
  ADN polimerasas y, 618-622F
    corrección de pruebas, 621-622
    elongación de cadena, 619-620F
    unión en la horquilla de replicación, 621
    síntesis simultánea de dos hebras, 622-626
  bidireccionalidad de, 616-617F
  complejo polipéptido en, 616
  definición, 615
  elongación de cadena durante la, 619-620F
  en eucariotas, 630T-634F
  errores en, 621-622
  etapas en, 616
  iniciación y terminación de, 629-630F
  modelo del replisoma en, 626-629F
  semiconservativo, 616F
  semidiscontinuo, 623
  síntesis discontinua durante, 623F
replicación discontinua del ADN, 623F
replicación semiconservadora del ADN, 615-616F
replisoma, 616, 617F. *Ver también* replicación de ADN
represión, 708-711F
represión por catabolito, 668-669, 670
represor *lac*, 665-668F
  estructura de, 667-668F
represores, 663, 664-665F
  represor *lac*, 665-667F
repulsión de carga, 34
residuo de 4-hidroxiprolina, 115F
residuo de alisina, 116F
residuo de asparagina, 716F
residuo de glutamato, 169-170F
  en tetrahidrofolato, 208
residuo de histidina, 169
residuo de lisina, 116F
residuo de *N*-terminal, 73-74F, 76
residuo S-carboximetilcisteína, 75F
residuos, 5
  aminoácido, 66-67
    secuencia de, 73-75F
  metionina, 76F
residuos acídicos, en histonas, 600T
residuos básicos, 600T
residuos C-terminal de homoserina lactona, 76
residuos de aminoácido polar, 163-164T
residuos de aminoácidos hidrofóbicos, mioglobina y, 117
residuos de aminoácidos, 67
  en sitios activos, 163-164T
  escala de hidropatía, 60T
  inhibición enzimática y, 147
  secuencia de, 73-75F
residuos de hidroxilisina, 115-116
residuos de hidroxiprolina, 115
residuos de serina, 153
resonancia magnética nuclear (NMR) espectroscopia, 89, 323
retículo endoplasmático,
  eucariota, 18-19F, 20
  síntesis de lípidos en, 488, 506
  transporte de proteínas en, 712-716F
reticulocitos, 708F
retinal, 195T, 213
retrovirus, 52
RF-1, 705
RF-2, 705
RF-3, 705
RFLPs (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción), 739, 740F
rho, 656, 658
ribitol, 233
riboflavina (vitamina B_2), 194T, 195T
  coenzimas de, 200F
  estructura de, 200F
riboflavina 5'-fosfato. *Ver* flavina mononucleótido
riboforina, 713, 715F
ribonucleasa A, 66, 89F, 107F, 108F, 109F
ribonucleasa (RNasa), 138T, 672F
ribonucleósido de purina, 177F
ribonucleósido difosfato reductasa. *Ver* ribonucleótido reductasa
ribonucleósido trifosfato reductasa, 569
ribonucleósidos
  estructuras químicas, 588F
  nomenclatura, 589T
ribonucleósidos trifosfato, 650, 651, 656
ribonucleótido reductasa, 569-570F
ribonucleótidos, 584
  nomenclatura, 589T
  radicales libres y reducción de, 570
  reducción a desoxirribonucleótidos, 569-570F
ribosa (Rib, β-D-ribofuranosa), 7
  abreviatura, 231T
  ciclización de, 227, 229F
  conformaciones de, 230F
  en nucleósidos y nucleótidos 196F
  estructura de, 8F, 224F, 584F
  grupos hidroxilo de, 588F
ribosa 5-fosfato, 231
ribosa 5-fosfato isomerasa, 367-369F
  en ruta de la pentosa fosfato, 366-370F
  estructura de, 232F
  interconversiones catalizadas por transcetolasa/transaldolasa y, 370F
  síntesis PRPP y, 558-559F
ribosomas, 17F, 85
  aminoacil-ARNt, sitios de unión en, 695F
  como sitios de síntesis de proteínas, 692-695F
  composición en, 693-694F
  desplazamiento en, 701, 702F

en diferentes especies, 693
en retículo endoplásmico, 20
estructura de, 693-694F
subunidades ARN de, 692-693F
subunidades de proteínas de, 692F, 693F
ribotimidilato, 687
ribulosa, 225, 226F
ribulosa 1, 5-*bi*fosfato
oxigenación de, 469F
ribulosa 1, 5-*bi*fosfato carboxilasa-oxigenasa (Rubisco), 465-469F
estructura de, 468F
función en la ruta de C_4, 474
oxigenación de 1, 5-*bi*fosfato, 469F
ribulosa 5-fosfato 3-epimerasa, en la ruta de la pentosa fosfato, 367-369F
ribulosa 5-fosfato, en la ruta de la pentosa fosfato, 366-369F
RNasa H, 729, 730F
RNasas (ribonucleasas)
en procesamiento de ARNt, 672F
número de rotación de, 138T
rotor, 432-433F
estructura de, 433F
RPA (factor de replicación A), 631
RPC (factor de replicación C), 631
RS sistema de nomenclatura configuracional, 56
Rubisco. *Ver* ribulosa 1, 5-*bi*fosfato carboxilasa-oxigenasa
rubriblastos, 708
ruta C_3 . *Ver* ciclo reductivo de la pentosa fosfato
ruta C_4, 473, 474, 475F
ruta catabólica, visión en conjunto, 305F
ruta de la glicólisis, 167
ruta de la pentosa fosfato, 366-370F
relación con otras rutas metabólicas, 307F
síntesis de ácidos grasos y, 481
ruta de la β-oxidación, 498, 504, 506, 508
ruta de reparación general por escisión, 636, 637F
ruta de señalización de la adenilil ciclasa, 287-288F, 375
ruta de señalización del inositol-fosfolípido, 288-290F
ruta de un solo paso, 300F
ruta metabólica cíclica, 299
ruta metabólica en espiral, 299
ruta metabólica lineal, 299
ruta multietapas, 300F
rutas de plegamiento, 110, 111F
rutas de reacción, 161
rutas metabólicas
definición, 299
en estado estable, 309
generalidades de, 304-306F
métodos de estudio de, 323-324
regulación de, 301-303F
tipos de, 304-306
S. *Ver* entropía
sacáridos. *Ver* carbohidratos
sacaropina, 548-549F
sacarosa (β-D-glucopiranosil-(1β 2)-β-D-fructofuranosida), 236
estructura de, 235F
hidrólisis de, 2
sacarosa 6-fosfato, 472F
sacarosa fosfato fosfatasa, 472F
sacarosa 6-fosfato sintasa, 472F
sacarosa fosforilasa, 165
Saccharomyces cerevisiae, 95F, 298
S-adenosilhomocisteína, 545F
S-adenosilmetionina (SAM)
como fuente del grupo metilo, 61, 608
como una coenzima, 195T, 196F
en el catabolismo de la metionina, 545F
síntesis del, 196F
y estructura de casquete de ARNm, 674
SAICAR (aminoimidazol succinilcarboxamida ribonucleótido), 560F
sales biliares, 264
absorción de lípidos de la dieta y, 509-510F
colesterol como precursor de, 496, 513
digestión de lípidos y, 258
glicina como precursora de, 537F
Sanger, Frederick, 77F, 632
sangre
sistema amortiguador, 47-48F, 554F
transporte de oxígeno en, 118-119F, 123
saturación, 134
saturación media, 145
SDS-electroforesis en gel de la poliacrilamida (SDS-PAGE), 69-70F, 105
secuencia de consenso, 654F, 676F, 678F, 680
secuenciación de genes, 77
secuenciador, 74
secuencias cos (cohesivas), 724, 725F
secuencias de Shine-Dalgarno, 696F, 697, 698F
secuencias de terminación, 656-658
segundo mensajero fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato (PIP_3), 375
segundo mensajero, 285F
selección, 727
mediante genes marcadores, 727-728
selección genética, 727
selenocisteína, 62F
semiquinonas, 201F, 214-215F
señal de terminación de rho independiente, 710
Ser-195, 148F, 184-187F
serina, 54
asignación de configuración mediante el sistema *RS*, 56F
biosíntesis de, 299F
cadenas laterales, 59F, 62
compuestos formados a partir de, 531F
degradación de, 542F
en hidrólisis ácida, 72
en síntesis de aminoácidos, 529-531F
en síntesis de lípidos, 492F
enlaces peptídicos en, 66F
estructura de, 54F, 261F
requerimiento energético para la síntesis, 534T
síntesis de, 529-531F
serina acetiltransferasa, 531F
serina deshidratasa, 542
serina esterasas, 147
serina hidroximetiltransferasa, 530F, 542, 572
serina palmitoíl transferasa, 492F
serina proteasas, 147
especificidad de sustrato de, 183-184F
mecanismos catalíticos de, 182-187F
propiedades de, 182-187F
zimógenos como precursores de enzimas inactivas, 182F
serum albúmina, 102F
SGLT1, 344
shikimate, síntesis del, 531-533F
silicio, 3
simetría diada, 658
síndrome de Lesch-Nyhan, 576, 739
Singer, S. Jonathan, 271
sintasas, 132
síntesis a partir de ribonucleótidos, 569-570F
síntesis de ADN. *Ver* replicación del ADN
Síntesis de ATP
a partir de GTP, 404F
ruta ciclo del ácido cítrico, 306
ruta fosforilación oxidativa, 415, 416, 419-421F, 432-435F, 437, 439
ruta glicólisis, 306, 328-332F
vía fotosíntesis, 444-445, 463
síntesis de escape, 666
síntesis de proteínas, 683-718
ARNt y, 686F-688T
código genético de, 683-686F
dirección de, 697
elongación de cadena en, 697-705
desplazamiento, 701-705F
formación de enlace peptídico, 700-701F
inserción del aminoacil-ARNt al sitio A, 699-700F
energética de, 705
inhibición de antibióticos de, 707
iniciación de, 695-697F
procesamiento de postraducción 712-716F
glicosilación de proteínas, 716F
hipótesis de señal de, 712-716F
regulación de, 705-711F
de traducción, 705-706
disponibilidad hemo y, 707-708F
regulación del operón *trp* y, 708-711F
ribosomas como sitios para, 692-695F
síntesis aminoacil-ARNt, 688-692F
terminación de, 705
traducción, 695-705
elongación de cadena en 697-705F
iniciación de, 695-697F
terminación de, 705
velocidad de, 698-699
y acoplamiento con trascripción, 699F
y secreción, 712-713F
y transporte a través de membranas, 712
Síntesis del ARN. *Ver* transcripción
sintetasas, 132
sistema amortiguador del dióxido de carbono-ácido carbónico-bicarbonato, 48
sistema de lanzadera de la carnitina, 501, 503F
sistema de rompimiento de la glicina, 543F
sistema de transporte del azúcar fosfoenolpiruvato, 333
sistema *DL* de nomenclatura configuracional, 56
sistema fosfotransferasa de azúcares dependientes, PEP, 670F
Sistema Internacional (SI) de unidades, 24-25T
sitio A (sitio aminoacil), 699-705
formación del enlace peptídico y, 700, 703F
inserción del ARNt en el, 699-701F
sitio activo, 134
definición de, 6
estados de transición y, 162
residuos aminoácidos en, 163-164T
sitio alostérico, 149
sitio aminoacilo. *Ver* sitio A
sitio de actividad, 569-570
sitio de especificidad, 570
sitio de pausa a la transcripción, 710, 711F
sitio de terminación, 616, 617F, 623, 630F
sitio E (sitio de salida), 701, 704F
sitio P (sitio peptidil), 698F, 699, 700-704F
sitio peptidilo (sitio P), 695-698F
sitio regulador, 149
sitios AP, 637, 638F
sitios de empalme, 677, 678F
sitios de pausa, 656-658
sitios de ramificación, 678F, 679F, 680
sitios de ruptura de nucleasa, 605F
SmaI, 609T
Smith, Michael, 743
sodio, 3

sodio duodecil sulfato (SDS), 69-70F
  estructura de, 32F
  y desnaturalización de proteínas, 108
solenoide, 603-604F
solubilidad
  de sustancias iónicas y polares en agua, 30-31
  de sustancias no polares en agua, 32-33F
solubilización, 32
solución ácida, 40
solución alcalina, 39
solución básica, 41
solvatación, 30
sonda, cribado de biblioteca ADN vía, 731-732F
sorbitol, 366F
sorbosa, 225, 226F
SR-B1, 512
SRP (partículas de reconocimiento de señales),
SSB (proteína de unión a una sola hebra), 626, 628F
Stahl, Franklin, W., 615
Staphylococcus aureus, 76, 243-244, 245F
Streptococcus pneumoniae, 3
subunidad 30S, de ribosoma, 693-694F
subunidad 40S, del ribosoma, 693
subunidad 50S, del ribosoma, 693-694F
subunidad 60S, de ribosoma, 693
subunidad 80S, de ribosoma, 692F
subunidad RuvA, 641, 642F
subunidad RuvB, 641, 642F
subunidad RuvC, 641
subunidad α, de ARN polimerasa, 649, 650
subunidad β, 649-650
subunidad(es) β
  de ADN polimerasa III, 618, 621F
  de ARN polimerasa, 649-650
subunidades σ, 655T
  de ARN polimerasa, 650
  reconocimiento del promotor por, 655
succinato deshidrogenasa y, 401
succinato en el ciclo del ácido cítrico, 385
  en ciclo del glioxilato, 407-409F
  estructura de, 401 F
succinato tioquinasa (succinil-CoA sintasa), 399-400F
succinato-ubiquinona oxidorreductasa (Complejo II), 425-427F. *Ver también* complejo succinato deshidrogenasa
  características, 423T
  energía libre estándar, 423T
  potenciales de reducción estándar, 423T
succinil-CoA, 211F, 364, 504F, 540F, 544F
  cetogénesis y, 515
  en catabolismo de las pirimidinas, 579-580F
  en ciclo del glioxilato, 408F
  en degradación de aminoácidos de cadena ramificada, 544F
  en síntesis de la porfirina, 406-407
succinil-CoA sintetasa (succinato tioquinasa), 399-400F
succinil-CoA transferasa, 515F
sufijo-*asa*, 130
sulfato de amonio, 67-68
sulfato de condroitina, 242-243F
β-sulfinilpiruvato, 546F
Sumner, James B., 130
superóxido dismutasa
  constante de velocidad aparente de segundo orden para, 167T
  como enzima de difusión controlada, 170-171
  número de recambio para, 138T
surco mayor, 594F
surco menor, 594F
surfactantes. *Ver* detergentes
sustancia de utilización del terminador (Tus), 630F
sustancias hidrofílicas, 30
sustancias iónicas, 30-31
sustancias no polares, 32-33F
sustancias polares, 30-31
sustitución nucleofílica, 159
sustituyentes axiales, de conformaciones en silla, 230
sustituyentes ecuatoriales, de conformación de silla, 231
sustratos proquirales, 397
sustratos, 129
  cinética de las reacciones de sustrato, 141-142F
  constantes cinéticas y, 139F
  especificidad de las serina proteasas, 183-184F
  unión débil a enzimas, 172-174F
Szent-Gyorgyi, Albert, 385
T7 bacteriófago, 660
tabla periódica de elementos, 4F
T-ADN (ADN transformador), 737, 738F
TAFs (factores asociados-TBP), 661T
tagatosa, 225, 226F
talasemia (deficiencia hereditaria de hemoglobina), 739
tallo aceptor, 686-88F, 691F, 699
talosa, 224F
Taq polimerasa, 741
tasa de aceleración, 140T
Tatum, Edward, 647
taurocolato, estructura de, 509F
tautómeros, 585, 586F
tejido adiposo, mantenimiento del nivel de glucosa y, 379-381
temperatura de transición de fase, 273
temperatura estándar, 308
tensión, 175
teofilina, estructura de, 288F
teoría ácido/base de Brønsted-Lowry, 38
teoría concertada de la regulación alostérica, 152-153F
teoría de la llave y cerradura, 2, 176
teoría de la simetría orientada (teoría concertada), 152-153F
teoría del ligando inducido (teoría secuencial), 152F, 153
teoría quimiosmótica, 418-420F
teoría secuencial (teoría del ligante inducido), 152F, 153
terapia genética, 740
terminación dependiente de *rho*, 658-659F
terminación -*ato*, 66
terminación -*il,* 66
terminación -*ina*, 66
terminación -*itol*, 233
terminación -*osa*, 223, 233
terminación -*ul*, 225
terminal desoxinucleotidiltransferasa, 723
terminales pegajosas, 722
terminología
  de bioquímica, 24-25T
  de química mecanicista, 158-160
termogenina, 435
terpenos, 254F, 496, 498F
testosterona, 496, 498F
  estructura de, 265F
tetraciclina, 707
tetradecanoato (miristato), 255T, 256
5, 6, 7, 8-tetrahidrobiopterina, 210F, 547F
tetrahidrofolato, 208-210F
  como coenzima, 195T
  en degradación de aminoácidos, 541-542F
  en la síntesis de dTMP, 571-573F
  en síntesis de nucleótidos, 530F
5, 6, 7, 8-tetrahidrofolato, 209F
α_2, β_2 tetrámero, 117F, 291
tetrosas, 224
TF. *Ver* factores de transcripción TFIIA, 661T, 662F
TFIIA, 661T, 662F
TFIID, 661T-662F
TFIIF (Factor 5, RAP30/74), 661T, 662, 663
TFIIS (RAP38, sII), 661T, 663
Thermus thermophilus, ribosoma, 693-694F
tiamina (vitamina B_1), 194T, 195T, 202-203F
tiamina pirofosfato (TPP)
  como coenzima, 202-203F
  en catabolismo de aminoácidos, 544
  en metabolismo de los piruvatos, 386
  transcetolasa y, 370
timidilato sintasa, 57l-573F
timidilato. *Ver* dTMP
timidina cinasa, en síntesis de dUMP, 573
timidina fosforilasa, 579
timidina. *Ver* desoxitimidina
timina (2, 4-dioxo-5-metilpirimidina, 5-metiluracilo)
  catabolismo de, 579-580F
  dímeros, reparación directa de, 635-636F
  estructura de, 9F, 563F, 585F
  tautómeros, 586F
  unión de hidrógeno por, 585-586
tiocianato, 32
tioésteres, 317-318
  en síntesis de ácidos grasos, 483
tiogalactósido transacetilasa, 665
tiol (sulfhidrilo), 164T
tiolasa, 499-500F
  en β-oxidación, 499F
  en metabolismo de cuerpos cetónicos, 515-516F
  en síntesis del colesterol, 495
tiol-disulfuro oxidorreductasa, 103F
tiólisis, 499-500F
tiorredoxina reductasa, 569F
tiorredoxina
  como coenzima, 216F
  en síntesis de desoxirribonucleótidos, 569F
  estructura de, 103F
tioserina. *Ver* cisteína
tirosil-ARN sintetasa, 690, 692
tirosina 76, 77F
  cadenas laterales, 72, 94
  degradación de, 546-548F
  derivados de, 61-62
  en hidrólisis ácida, 72
  estructura de, 58F
  función catalítica de, 163T
  modos de unión de, 172
  requerimientos energéticos para la síntesis, 534T
  síntesis de, 531-533F, 546-548F
tirosina fosfatasa, PTP-1B, 516
tiroxina, 61F
titulación, 44-46F
T_m. *Ver* punto de fusión
α-tocoferol (vitamina E), 213-214F, 496, 498F
Tomudex (ZD1694), estructura de, 572F
topoisomerasas, 598-599F, 626, 641
topoisomerasa II (girasa), 626
topoisomerasas del tipo II. *Ver* topoisomerasas
topoisomerasas tipo I. *Ver* topoisomerasas
toxinas, 53, 67
TPP. *Ver* tiamina pirofosfato
traducción, 53. *Ver también* síntesis de proteínas

trans-2-enoíl CoA, 500, 502
en β-oxidación, 505F
transaldolasa
en ruta pentosa fosfato, 367F
interconversiones catalizadas por, 370F
transaminasas (aminotransferasas)
descripción de, 525
mecanismo de, 205-207F
número de recambio de, 138T
transcarboxilasa, 481
transcetolasa
en la ruta pentosa fosfato, 367F, 370F
interconversiones catalizadas mediante, 370F
y tiamina pirofosfato, 203F
transcripción inversa, 648
transcripción, 584, 647-682
acoplada con traducción, 647
de operón *lac*, 665-670F
activación de proteína regulatoria cAMP de, 668-670F
bloqueo del represor *lac*, 665-666F
definición, 649
dirección de, 653F
en eucariotas, 659T-663F
ARN polimerasa eucariótico, 660T
factores de transcripción, 661F-665T
iniciación de, 652F-656T
conformación ARN polimerasa y, 655-656
formación del complejo de transcripción 652, 653-655
frecuencia de, 653
orientación de genes de, 653F
reconocimiento del promotor por subunidad σ, 655
reacción general de, 652F
regulación de, 663-665F
tasa de error de, 652
terminación de, 556-559F
velocidad de, 651
transcripciones primarias, 671, 672
transcriptasa inversa, 52
transducción de señal, 284-292F
por proteínas G, 285-287F
receptor tirosina cinasa y, 291-292F
ruta de señalización del adenilil ciclasa, 287-288F
ruta de señalización del inositol-fosfolípido, 288-290F
transductor, 285F
transferasas, 131F
transferencia del grupo nucleotidilo, 316-317F
transferencia grupo fosforilo, 315-316F
transformación genética, 721
transición de fase, 273-274F
transportador GLUT4, 375, 380
transportadores de hexosa, 344-346F
transporte activo, 281-282F
transporte activo primario, 282
transporte activo secundario, 282-283F
transporte cíclico de electrones, 464
transporte pasivo (difusión facilitada), 281F
transposones, 639
trans-retinol. *Ver* vitamina A
traslación de muesca, 624, 625F
trazadores isotópicos, 323
treonina, 54, 59F, 60T
treonina aldolasa, 543F
treonina deshidrogenasa, 543F
degradación de, 543F
en hidrólisis ácida, 72
en síntesis de la isoleucina, 528-529F
requerimiento energético para la síntesis, 534T
síntesis de, 527-528F
treosa, estructura de, 224F
triacilgliceroles (triglicéridos), 258-259F. *Ver también* metabolismo lípido
absorción de, 509-510
almacenamiento de energía vía, 306, 479
descripción de, 253
digestión de, 258, 306
en metabolismo de lipoproteínas, 510F-512T
en organización lípida, 254F
estructura de, 258F
síntesis de, 485-488F
trieno, 490
triglicéridos. *Ver* triacilgliceroles
triyodotironina, 61F
trioleína, 258
triosa cinasa, 350
triosa fosfato isomerasa
como una enzima de difusión controlada, 167F-170T
constante de velocidad aparente de segundo orden para, 167T
diagrama de energía para una reacción catalizada mediante, 169F
en glicólisis, 331F, 335-336, 350F, 351
estructura de, 105, 106F
inhibición irreversible de, 147-148F
tasa de aceleración de, 140T
triosa fosfato. *Ver también* dihidoxiacetona fosfato; gliceraldehído 3-fosfato
en biosíntesis de sacarosa, 472F
triosas, 223
2, 6, 8-trioxopurina. *Ver* ácido úrico
tripalmitina, 258
triple hélice, en colágeno, 115-116
tripsina, 76, 77F, 130
inhibición por benzamidina, 145
número de recambio de, 138T
sintetizada y almacenada como zimógenos, 182-184F
tripsinógeno, 182
triptofanil-ARNt^{Trp}, 710
triptófano (indolealanina), 58F, 76, 77F, 172
como correpresor del operón *trp*, 708-711F
degradación de, 197, 547-548F
requerimiento energético para síntesis, 534T
síntesis de, 531-535F
triptófano sintasa, 154, 531-535F
tromboxano A_2 (TxA_2), 488-489F
estructura de, 266F
tubulina, 22, 53
Tus (sustancia de utilización del terminador), 630F
TxA_2 (tromboxano A_2), 266F, 488-489F
ubiquinación, de proteínas, 539F
ubiquinol. *Ver* ubiquinona
ubiquinol-citocromo c oxidorreductasa (complejo III), 427-429F, 437F
características, 423T
energía libre estándar, 423T
potenciales de reducción estándar, 423T
ubiquinona (coenzima Q, Q/QH_2), 214-215F
como una coenzima, 195T
en β-oxidación, 50 I
en catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada, 544F
en ciclo del ácido cítrico, 392F, 401
en gluconeogénesis, 363
en oxidación de ácidos grasos, 500
en síntesis de nucleótidos de pirimidina, 566
en transporte de electrones, 421-422F, 424, 425
estados de oxidación, 214-215F, 319
estructura de, 215F
isopentenil pirofosfato como un precursor, 498F
potencial de reducción estándar de, 423T
ubiquitina, 538-539F
UDP *N*-acetilglucosamina acil transferasa, 102F
UDP-galactosa, 351F
UDP-glucosa pirofosforilasa
en síntesis de la sacarosa, 472F
en síntesis del glucógeno, 371
UDP-glucosa pirofosforilasa, 472F
UDP-glucosa
como coenzima, 196, 197F
en glicólisis, 351F
en síntesis de la sacarosa, 472F
última hipótesis de los intrones, 678
último ancestro común (LCA), 55
unidad de Svedberg, 672
unidad βαβ, 99F
unidades SI *(Sistema Internacional),* 24-25T
unión de Holliday, 615F
unión de ligandos, 664F, 665, 668
unión de moduladores alostéricos, 121
unión isoleucil-ARNt sintetasa, 692F
uniones éster fosfato, 4
uniones fosfoanhídrido, 4
uniones fosfodiéster
en ADN, 590-592F
estructura de, 9F
unipuerto, 281F
uracilo (2, 4-dioxopirimidina), 11, 585-586
capacidad de enlazamiento del hidrógeno del, 586
catabolismo de, 579-580F
estructura del, 563F, 585F
tautómeros, 586F
uracilo *N*-glicosilasa, 637-638F
urato de sodio, estructura de, 576F
urato oxidasa (uricasa), 577F
urato. *Ver* ácido úrico
urea
en catabolismo del ácido úrico, 577-578F
estructura de, 549F
síntesis de. *Ver* ciclo de la urea
y desnaturalización de proteínas, 108F, 109F
ureasa, 130, 577-578F
ureidoisobutirato, 579-580F
ureidoproprionato, 579F
uridilato cinasa, 568
uridilato. *Ver* UMP
uridina, 587, 588F, 589T
uridina 5'-monofosfato. *Ver* UMP
uridina difosfato galactosa (UDP-galactosa), 351F
uridina difosfato glucosa. *Ver* UDP-glucosa
uridina fosforilasa, 579
uridina trifosfato. *Ver* UTP
UTP (uridina trifosfato), 196
ARN polimerasa y, 651
como un compuesto rico en energía, 312
con magnesio, 311
en metabolismo de nucléotidos de pirimidina, 567
en síntesis del glucógeno, 371
v (velocidad), 133F, 134F, 135F
$V_{máx}$ (velocidad máxima), 135-136F, 138F, 139F, 140-141F
v_0 (velocidad inicial), 135
vacunas, 123
vacuolas, 18, 19F, 21-22
valil-adenilato, 691-692
valina, 57F, 58, 73
degradación de, 543-544F
requerimiento energético para la síntesis, 534T
síntesis del, 528-529F
unión isoleucil-ARNt sintetasa, 692F
van der Waals, Johannes Diderik, 35

vector de lanzadera de la levadura, 724, 726F
vectores
  bacteriófago, 723-724, 725F
  clonación, 721-727F
  cósmido, 724
  definición, 721
  lanzadera, 724, 726F
  plásmido, 723F
vectores de clonación, 721-727F
  cromosomas artificiales de levaduras, 724-727F
  vectores fagos, 723-724, 725F
  vectores lanzadera, 724, 726F
  vectores plásmidos, 723F
vectores de expresión, 734-735F
vectores del bacteriófago γ, 723-724, 725F
vectores fago, 723-724, 725F
vectores fago l, construcción de bibliotecas de ADNc y, 730
vectores lanzadera, 724, 726F
vectores plásmidos, 723F
  como vectores de expresión, 735F
  construcción de bibliotecas ADNc y, 730
velocidad *(v),* 133F, 134F, 135F
velocidad inicial (v_0), 135F, 136F
velocidad máxima ($V_{máx}$), 135-136F, 138F, 139F, 140-141F
Ver también p*K*
vesículas, 19F
Viagra, 538
VIH-I (virus de la inmunodeficiencia humana 1), 52
virus de la inmunodeficiencia humana I (VIH-I), 52
virus, 16-17. *Ver también* bacteriófago
  genoma, 584
  proteínas ancladas por lípidos a membrana en, 277
vitalistas, 130
vitamina A *(trans*-retinol), 213F, 496, 498F
vitamina B_1 (tiamina), 194T, 195T, 202-203F
vitamina B_{12}. *Ver* cobalamina
vitamina B_2 (riboflavina), 194T, 195T 200F
vitamina B_3 (pantotenato), 194T, 195T, 201-202F
vitamina B_6 (folato), 194T, 195T, 208-209F
vitamina B_6 (piridoxina), 195T, 205F
vitamina C (ácido ascórbico)
  como coenzima, 194T, 195
  estructura de, 234F
  y escorbuto, 115
vitamina D (colecalciferol), 213, 496
vitamina D_3, 213F
vitamina E (α-tocoferol), 213-214F, 496, 498F
vitamina K (filoquinona)
  como coenzima, 195T
  en la fotosíntesis, 453-454F
  estructura de, 214F
  vitaminas, 194-195T
    enfermedad de deficiencia nutricional, 194T
    lípidas, 214F
vitaminas B, 194T. *Ver también vitaminas individuales*
vitaminas hidrosolubles, 194
vitaminas lipídicas, 212-214F, 267
  descripción de, 194, 212
  e hipervitaminas, 194
  en organización lípida, 254F
vitaminas liposolubles. *Ver* vitaminas lipídicas
Watson, James D., 3, 584, 590, 615
Wilkins, Maurice, 590
Williams, Ronald, 418
Wohler, Friedrich, 2
xantina, 561, 575-577F
xantina deshidrogenasa, 575-576F
xantina oxidasa, 575-576F
xantosina monofosfato (XMP), 561-563F
*Xba*I, 609T
X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido), 728F
XH2, 420-421F
*Xho*I, 609T
xilosa (Xyl)
  abreviatura, 231T
  en glicoproteínas, 245
  estructura de, 224F
xilulosa, 225
  estructura de, 226F
xilulosa 5-fosfato
  en ruta pentosa fosfato, 368-370F
  interconversiones catalizadas por transcetolasa/transaldolasa y, 370F
XMP (xantosina monofosfato), 561-563F
Y (saturación fraccional), 119F
YAC (cromosoma de levadura artificial), 724-727F
yodoacetato, 75F
Young, William John, 329
Z-ADN, 597F
Zif268, 647F
zimasa, 329
zimógenos 258
  como precursores de enzimas inactivas, 182F
zinc, como cofactor, 193
zwiteriones (iones dipolares), 54, 65

IA												IIIA	IVA	VA	VIA	VIIA	0
1 **H** 1.008	IIA																2 **He** 4.003
3 **Li** 6.941	4 **Be** 9.012											5 **B** 10.81	6 **C** 12.01	7 **N** 14.01	8 **O** 16.00	9 **F** 19.00	10 **Ne** 20.18
11 **Na** 22.99	12 **Mg** 24.31	IIIB	IVB	VB	VIB	VIIB	VIIIB			IB	IIB	13 **Al** 26.98	14 **Si** 28.09	15 **P** 30.97	16 **S** 32.07	17 **Cl** 35.45	18 **Ar** 39.95
19 **K** 39.10	20 **Ca** 40.08	21 **Sc** 44.96	22 **Ti** 47.87	23 **V** 50.94	24 **Cr** 52.00	25 **Mn** 54.94	26 **Fe** 55.85	27 **Co** 58.93	28 **Ni** 58.69	29 **Cu** 63.55	30 **Zn** 65.39	31 **Ga** 69.72	32 **Ge** 72.61	33 **As** 74.92	34 **Se** 78.96	35 **Br** 79.90	36 **Kr** 83.80
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 **Tc** (98)	44 **Ru** 101.1	45 **Rh** 102.9	46 **Pd** 106.4	47 **Ag** 107.9	48 **Cd** 112.4	49 **In** 114.8	50 **Sn** 118.7	51 **Sb** 121.8	52 **Te** 127.6	53 **I** 126.9	54 **Xe** 131.3
55 **Cs** 132.9	56 **Ba** 137.3	57 * **La** 138.9	72 **Hf** 178.5	73 **Ta** 180.9	74 **W** 183.8	75 **Re** 186.2	76 **Os** 190.2	77 **Ir** 192.2	78 **Pt** 195.1	79 **Au** 197.0	80 **Hg** 200.6	81 **Tl** 204.4	82 **Pb** 207.2	83 **Bi** 209.0	84 **Po** (209)	85 **At** (210)	86 **Rn** (222)
87 **Fr** (223)	88 **Ra** (226)	89** **Ac** (227)	104 **Rf** (261)	105 **Db** (262)	106 **Sg** (263)	107 **Bh** (264)	108 **Hs** (265)	109 **Mt** (268)	110 (269)	111 (272)	112 (277)	113	114 (285)	115	116 (289)	117	118 (293)

58* **Ce** 140.1	59 **Pr** 140.9	60 **Nd** 144.2	61 **Pm** (145)	62 **Sm** 150.4	63 **Eu** 152.0	64 **Gd** 157.3	65 **Tb** 158.9	66 **Dy** 162.5	67 **Ho** 164.9	68 **Er** 167.3	69 **Tm** 168.9	70 **Yb** 173.0	71 **Lu** 175.0
90** **Th** 232.0	91 **Pa** 231	92 **U** 238.0	93 **Np** (237)	94 **Pu** (244)	95 **Am** (243)	96 **Cm** (247)	97 **Bk** (247)	98 **Cf** (251)	99 **Es** (252)	100 **Fm** (257)	101 **Md** (258)	102 **No** (259)	103 **Lr** (262)

Figura 1.1▲
Tabla periódica de los elementos. Los elementos importantes encontrados en las células vivas se muestran a color. Los elementos en color rosa (CHNOPS) son los seis elementos más abundantes. Los cinco iones esenciales están en violeta. Los elementos traza se muestran en azul oscuro (más comunes) y en azul claro (los menos comunes).

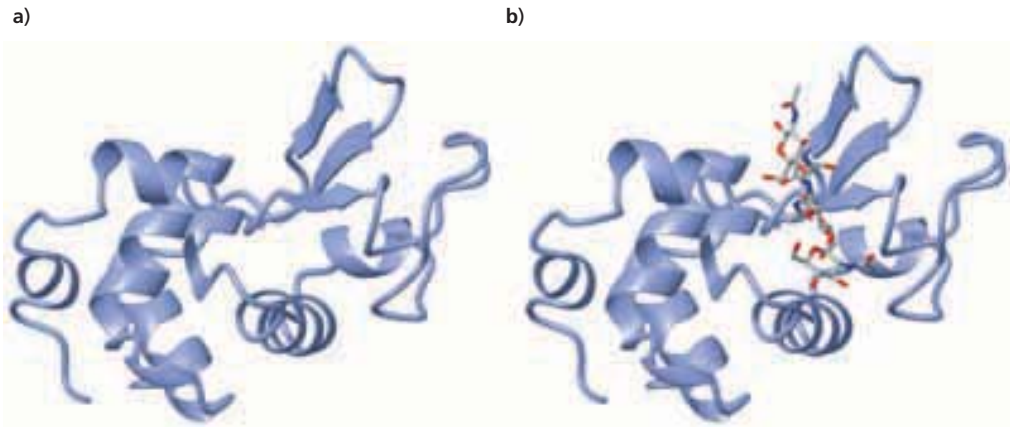


Figura 1.4▲
Lisozima de clara de huevo de gallina (*Gallus gallus*). **a)** Lisozima libre. Obsérvese la hendidura característica que contiene al sitio activo de la enzima. **b)** La lisozima unida al sustrato. [PDB 1LZC].

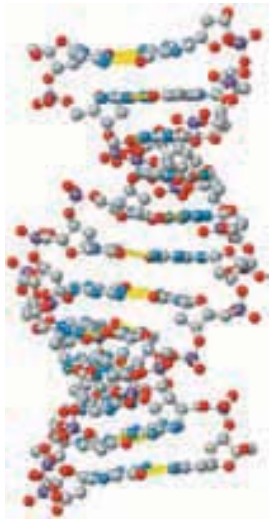
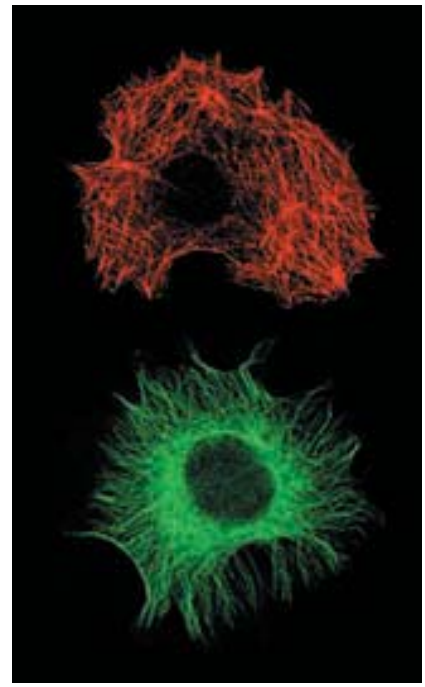
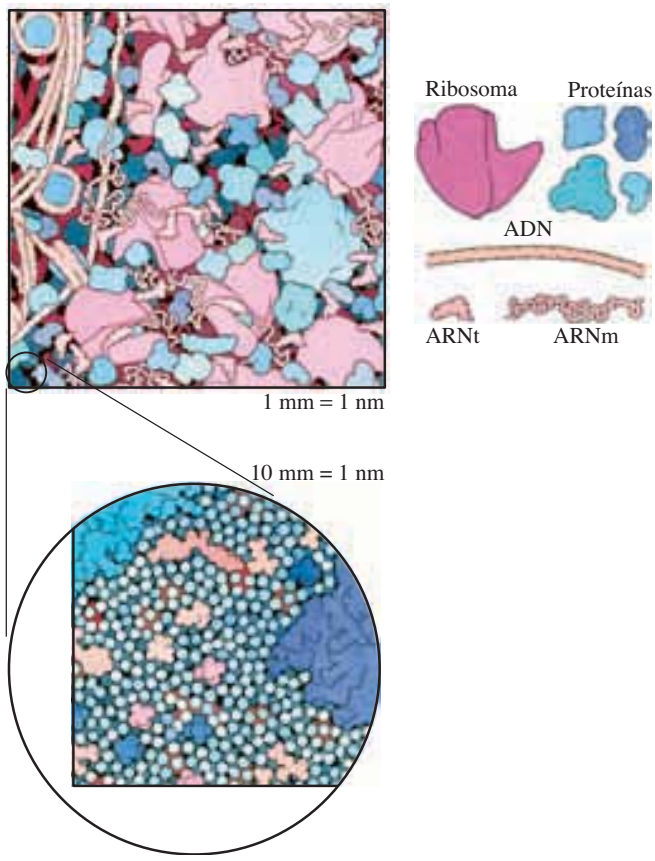


Figura 1.10 ▲
Segmento corto de una molécula de ADN. Dos diferentes polinucleótidos se asocian para formar una doble hélice. Las secuencias de pares de bases en el interior de la hélice transportan la información genética.

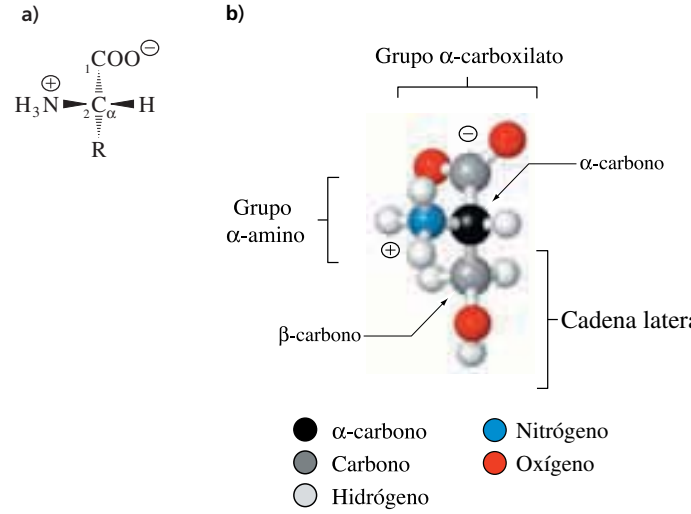


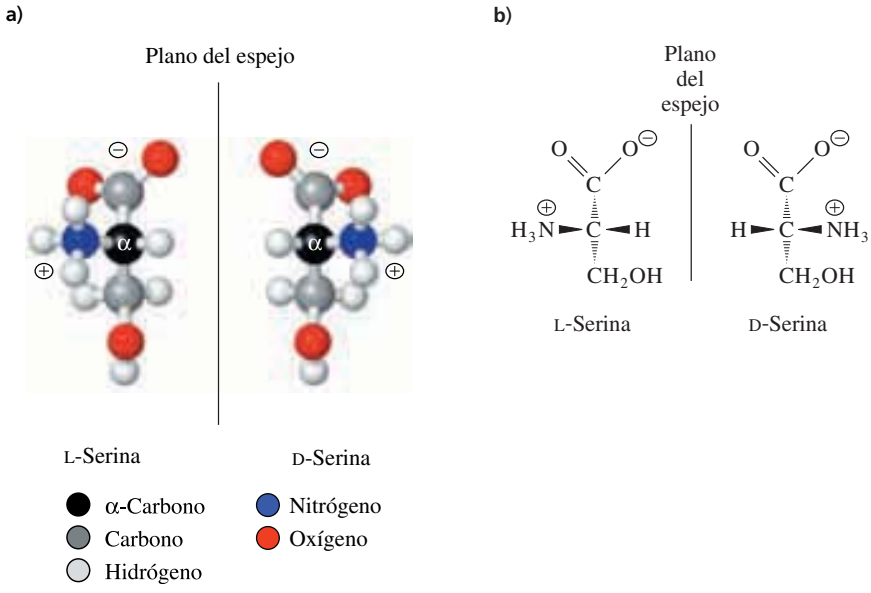
◀ Figura 1.16
Micrografías de filamentos de actina y microtúbulos marcados con fluorescencia en células de mamíferos. **(Parte superior)** Filamentos de actina en células musculares de rata. **(Parte inferior)** Microtúbulos en células endoteliales humanas.



◀ Figura 1.17
Porción del citosol de una célula de *E. coli.* La parte superior de la ilustración, en la cual el contenido está aumentado un millón de veces, representa una ventana de 100 × 100 nm. Las proteínas se encuentran sombreadas en azul y verde. Los ácidos nucleicos están en rosa. Las estructuras grandes son los ribosomas. El agua y los pequeños metabolitos no se muestran. Los contenidos en el interior del círculo están aumentados 10 millones de veces y muestran agua y otras pequeñas moléculas.

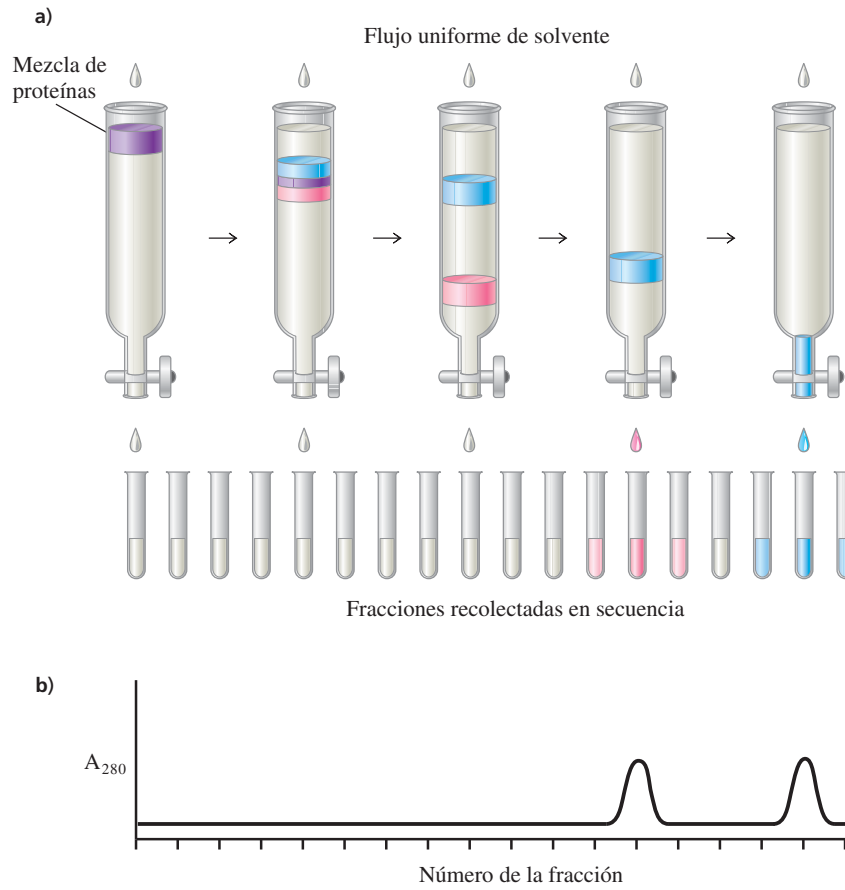
Figura 3.1 ▶
Dos representaciones de un L-aminoácido a pH neutro. **a)** Estructura general. Un aminoácido tiene un grupo carboxilato (donde el átomo de carbono es el C-1), un grupo amino, un átomo de hidrógeno y una cadena lateral (o grupo R), todos unidos al C-2 (el carbono α). Las cuñas llenas indican los enlaces arriba del plano del papel, las cuñas entrecortadas indican enlaces atrás del plano del papel. Los extremos grandes de las cuñas están más cerca del espectador que los extremos puntiagudos. **b)** Modelo de bolas y palillos de la serina (cuyo grupo R es —CH_2OH). Obsérvense los sistemas alternativos de numeración y letras para los átomos de carbono.

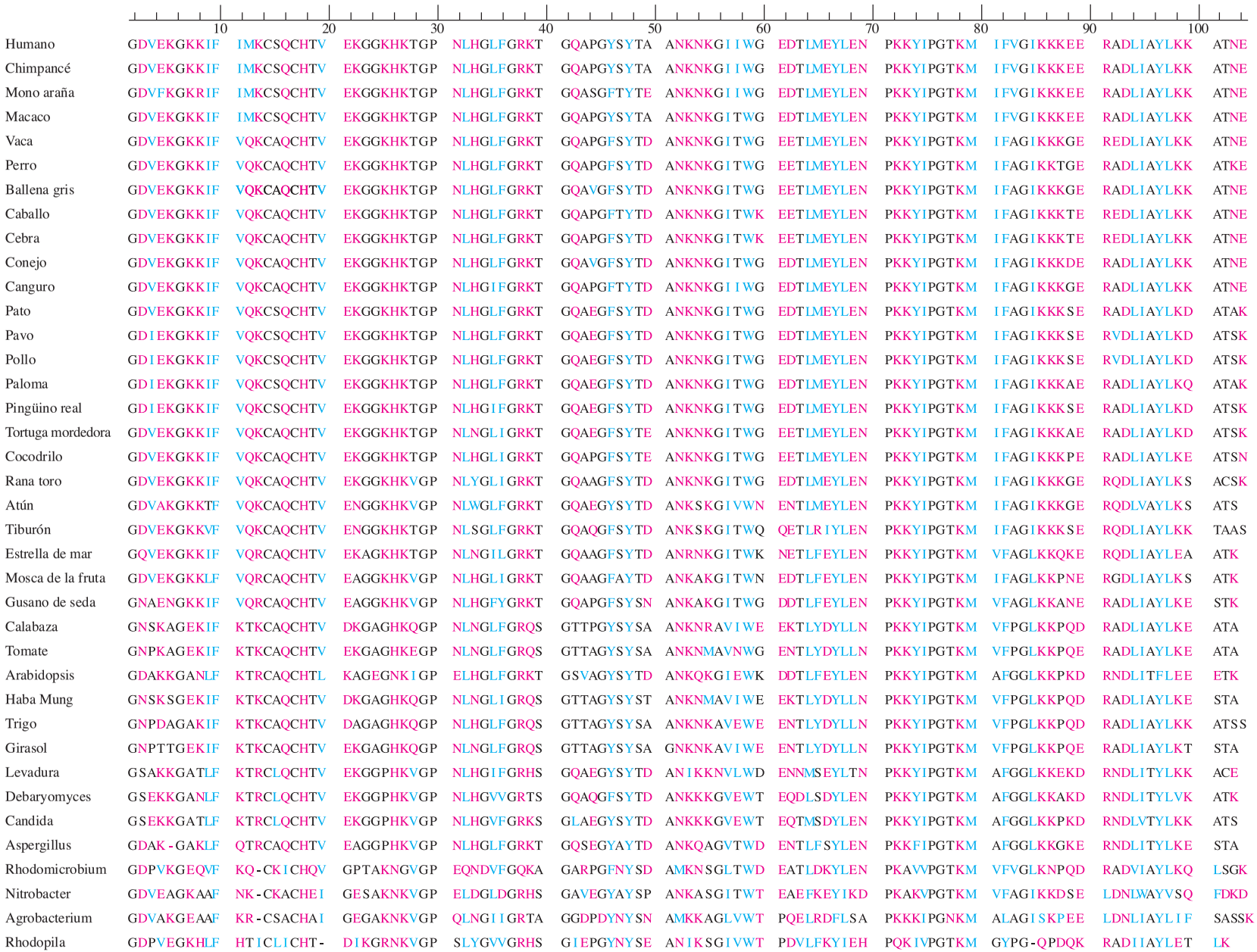




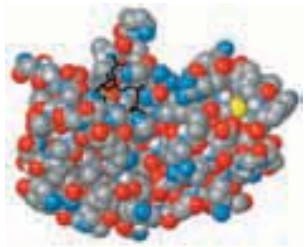
◀ **Figura 3.2**
Pares de imágenes especulares de aminoácidos. **a)** Modelos de bolas y palillos de L-serina y D-serina. Obsérvese que las dos moléculas no son idénticas; no se pueden sobreponer. **b)** L-Serina y D-serina.

Figura 3.11 ▶
Cromatografía en columna. **a)** Se agrega una mezcla de proteínas a una columna que contiene una matriz sólida; entonces el solvente pasa por la columna desde un recipiente. El solvente lava las distintas proteínas (representadas por bandas roja y azul), que recorren la columna a distintas velocidades dependientes de sus interacciones con la matriz. El eluato se recolecta en una serie de fracciones, algunas de las cuales se muestran. **b)** Se determina la concentración de proteínas en cada fracción midiendo la absorbencia a 280 nm. Los picos corresponden a las bandas de elución de proteína en a). Entonces se analiza la proteína buscada en las fracciones.




10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
Humano GDVEKGKKIF IMKCSQCHTV EKGGKHKTGP NLHGLFGRKT GQAPGYSYTA ANKNKGIIWG EDTLMEYLEN PKKYIPGTKM IFVGIKKKEE RADLIAYLKK ATNE
Chimpancé GDVEKGKKIF IMKCSQCHTV EKGGKHKTGP NLHGLFGRKT GQAPGYSYTA ANKNKGIIWG EDTLMEYLEN PKKYIPGTKM IFVGIKKKEE RADLIAYLKK ATNE
Mono araña GDVFKGKRIF IMKCSQCHTV EKGGKHKTGP NLHGLFGRKT GQASGFTYTE ANKNKGIIWG EDTLMEYLEN PKKYIPGTKM IFVGIKKKEE RADLIAYLKK ATNE
Macaco GDVEKGKKIF IMKCSQCHTV EKGGKHKTGP NLHGLFGRKT GQAPGYSYTA ANKNKGITWG EDTLMEYLEN PKKYIPGTKM IFVGIKKKEE RADLIAYLKK ATNE
Vaca GDVEKGKKIF VQKCAQCHTV EKGGKHKTGP NLHGLFGRKT GQAPGFSYTD ANKNKGITWG EETLMEYLEN PKKYIPGTKM IFAGIKKKGE REDLIAYLKK ATNE
Perro GDVEKGKKIF VQKCAQCHTV EKGGKHKTGP NLHGLFGRKT GQAPGFSYTD ANKNKGITWG EETLMEYLEN PKKYIPGTKM IFAGIKKTGE RADLIAYLKK ATKE
Ballena gris GDVEKGKKIF VQKCAQCHTV EKGGKHKTGP NLHGLFGRKT GQAVGFSYTD ANKNKGITWG EETLMEYLEN PKKYIPGTKM IFAGIKKKGE RADLIAYLKK ATNE
Caballo GDVEKGKKIF VQKCAQCHTV EKGGKHKTGP NLHGLFGRKT GQAPGFTYTD ANKNKGITWK EETLMEYLEN PKKYIPGTKM IFAGIKKKTE REDLIAYLKK ATNE
Cebra GDVEKGKKIF VQKCAQCHTV EKGGKHKTGP NLHGLFGRKT GQAPGFSYTD ANKNKGITWK EETLMEYLEN PKKYIPGTKM IFAGIKKKTE REDLIAYLKK ATNE
Conejo GDVEKGKKIF VQKCAQCHTV EKGGKHKTGP NLHGLFGRKT GQAVGFSYTD ANKNKGITWG EDTLMEYLEN PKKYIPGTKM IFAGIKKKDE RADLIAYLKK ATNE
Canguro GDVEKGKKIF VQKCAQCHTV EKGGKHKTGP NLHGIFGRKT GQAPGFTYTD ANKNKGIIWG EDTLMEYLEN PKKYIPGTKM IFAGIKKKGE RADLIAYLKK ATNE
Pato GDVEKGKKIF VQKCSQCHTV EKGGKHKTGP NLHGLFGRKT GQAEGFSYTD ANKNKGITWG EDTLMEYLEN PKKYIPGTKM IFAGIKKKSE RADLIAYLKD ATAK
Pavo GDIEKGKKIF VQKCSQCHTV EKGGKHKTGP NLHGLFGRKT GQAEGFSYTD ANKNKGITWG EDTLMEYLEN PKKYIPGTKM IFAGIKKKSE RVDLIAYLKD ATSK
Pollo GDIEKGKKIF VQKCSQCHTV EKGGKHKTGP NLHGLFGRKT GQAEGFSYTD ANKNKGITWG EDTLMEYLEN PKKYIPGTKM IFAGIKKKSE RVDLIAYLKD ATSK
Paloma GDIEKGKKIF VQKCSQCHTV EKGGKHKTGP NLHGLFGRKT GQAEGFSYTD ANKNKGITWG EDTLMEYLEN PKKYIPGTKM IFAGIKKKAE RADLIAYLKQ ATAK
Pingüino real GDIEKGKKIF VQKCSQCHTV EKGGKHKTGP NLHGIFGRKT GQAEGFSYTD ANKNKGITWG EDTLMEYLEN PKKYIPGTKM IFAGIKKKSE RADLIAYLKD ATSK
Tortuga mordedora GDVEKGKKIF VQKCAQCHTV EKGGKHKTGP NLNGLIGRKT GQAEGFSYTE ANKNKGITWG EETLMEYLEN PKKYIPGTKM IFAGIKKKAE RADLIAYLKD ATSK
Cocodrilo GDVEKGKKIF VQKCAQCHTV EKGGKHKTGP NLHGLIGRKT GQAPGFSYTE ANKNKGITWG EETLMEYLEN PKKYIPGTKM IFAGIKKKPE RADLIAYLKE ATSN
Rana toro GDVEKGKKIF VQKCAQCHTV EKGGKHKVGP NLYGLIGRKT GQAAGFSYTD ANKNKGITWG EDTLMEYLEN PKKYIPGTKM IFAGIKKKGE RQDLIAYLKS ACSK
Atún GDVAKGKKTF VQKCAQCHTV ENGGKHKVGP NLWGLFGRKT GQAEGYSYTD ANKSKGIVWN ENTLMEYLEN PKKYIPGTKM IFAGIKKKGE RQDLVAYLKS ATS
Tiburón GDVEKGKKVF VQKCAQCHTV ENGGKHKTGP NLSGLFGRKT GQAQGFSYTD ANKSKGITWQ QETLRIYLEN PKKYIPGTKM IFAGIKKKSE RQDLIAYLKK TAAS
Estrella de mar GQVEKGKKIF VQRCAQCHTV EKAGKHKTGP NLNGILGRKT GQAAGFSYTD ANRNKGITWK NETLFEYLEN PKKYIPGTKM VFAGLKKQKE RQDLIAYLEA ATK
Mosca de la fruta GDVEKGKKLF VQRCAQCHTV EAGGKHKVGP NLHGLIGRKT GQAAGFAYTD ANKAKGITWN EDTLFEYLEN PKKYIPGTKM IFAGLKKPNE RGDLIAYLKS ATK
Gusano de seda GNAENGKKIF VQRCAQCHTV EAGGKHKVGP NLHGFYGRKT GQAPGFSYSN ANKAKGITWG DDTLFEYLEN PKKYIPGTKM VFAGLKKANE RADLIAYLKE STK
Calabaza GNSKAGEKIF KTKCAQCHTV DKGAGHKQGP NLNGLFGRQS GTTPGYSYSA ANKNRAVIWE EKTLYDYLLN PKKYIPGTKM VFPGLKKPQD RADLIAYLKE ATA
Tomate GNPKAGEKIF KTKCAQCHTV EKGAGHKEGP NLNGLFGRQS GTTAGYSYSA ANKNMAVNWG ENTLYDYLLN PKKYIPGTKM VFPGLKKPQE RADLIAYLKE ATA
Arabidopsis GDAKKGANLF KTRCAQCHTL KAGEGNKIGP ELHGLFGRKT GSVAGYSYTD ANKQKGIEWK DDTLFEYLEN PKKYIPGTKM AFGGLKKPKD RNDLITFLEE ETK
Haba Mung GNSKSGEKIF KTKCAQCHTV DKGAGHKQGP NLNGLIGRQS GTTAGYSYST ANKNMAVIWE EKTLYDYLLN PKKYIPGTKM VFPGLKKPQD RADLIAYLKE STA
Trigo GNPDAGAKIF KTKCAQCHTV DAGAGHKQGP NLHGLFGRQS GTTAGYSYSA ANKNKAVEWE ENTLYDYLLN PKKYIPGTKM VFPGLKKPQD RADLIAYLKK ATSS
Girasol GNPTTGEKIF KTKCAQCHTV EKGAGHKQGP NLNGLFGRQS GTTAGYSYSA GNKNKAVIWE ENTLYDYLLN PKKYIPGTKM VFPGLKKPQE RADLIAYLKT STA
Levadura GSAKKGATLF KTRCLQCHTV EKGGPHKVGP NLHGIFGRHS GQAEGYSYTD ANIKKNVLWD ENNMSEYLTN PKKYIPGTKM AFGGLKKEKD RNDLITYLKK ACE
Debaryomyces GSEKKGANLF KTRCLQCHTV EKGGPHKVGP NLHGVVGRTS GQAQGFSYTD ANKKKGVEWT EQDLSDYLEN PKKYIPGTKM AFGGLKKAKD RNDLITYLVK ATK
Candida GSEKKGATLF KTRCLQCHTV EKGGPHKVGP NLHGVFGRKS GLAEGYSYTD ANKKKGVEWT EQTMSDYLEN PKKYIPGTKM AFGGLKKPKD RNDLVTYLKK ATS
Aspergillus GDAK-GAKLF QTRCAQCHTV EAGGPHKVGP NLHGLFGRKT GQSEGYAYTD ANKQAGVTWD ENTLFSYLEN PKKFIPGTKM AFGGLKKGKE RNDLITYLKE STA
Rhodomicrobium GDPVKGEQVF KQ-CKICHQV GPTAKNGVGP EQNDVFGQKA GARPGFNYSD AMKNSGLTWD EATLDKYLEN PKAVVPGTKM VFVGLKNPQD RADVIAYLKQ LSGK
Nitrobacter GDVEAGKAAF NK-CKACHEI GESAKNKVGP ELDGLDGRHS GAVEGYAYSP ANKASGITWT EAEFKEYIKD PKAKVPGTKM VFAGIKKDSE LDNLWAYVSQ FDKD
Agrobacterium GDVAKGEAAF KR-CSACHAI GEGAKNKVGP QLNGIIGRTA GGDPDYNYSN AMKKAGLVWT PQELRDFLSA PKKKIPGNKM ALAGISKPEE LDNLIAYLIF SASSK
Rhodopila GDPVEGKHLF HTICLICHT- DIKGRNKVGP SLYGVVGRHS GIEPGYNYSE ANIKSGIVWT PDVLFKYIEH PQKIVPGTKM GYPG-QPDQK RADIIAYLET LK

a)



b)

c)

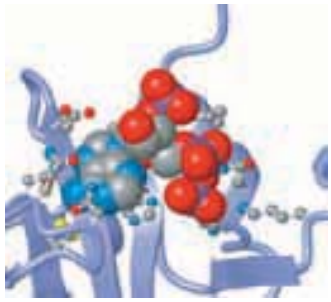


Figura 4.3 ▲
Ribonucleasa A bovina (*Bos taurus*). La ribonucleasa A es una enzima secretada que hidroliza al ARN durante la digestión. **a)** Modelo tridimensional mostrando un sustrato análogo enlazado en negro. **b)** Modelo de listón de la cadena de polipéptido mostrando la estructura secundaria. **c)** Vista del sitio de enlace con el sustrato. El análogo de sustrato (3-fosfato de 5′-difosfoadenosina) se representa como modelo tridimensional y las cadenas laterales de aminoácidos se muestran como modelos de bolas y palillos. [PDB 1 AFK].

▲ Figura 4.4
Estructura de la ribonucleasa bovina A por RMN. En la figura se combina un conjunto de estructuras muy parecidas que satisfacen los datos de interacciones atómicas. Sólo se muestra la espina dorsal de la cadena de polipéptido. Compárese esta estructura con la de la figura 4.3b y nótese la presencia de puentes de disulfuro (en amarillo), que no se muestran en las imágenes obtenidas por la estructura cristalina mediante rayos X. [PDB 2AAS].

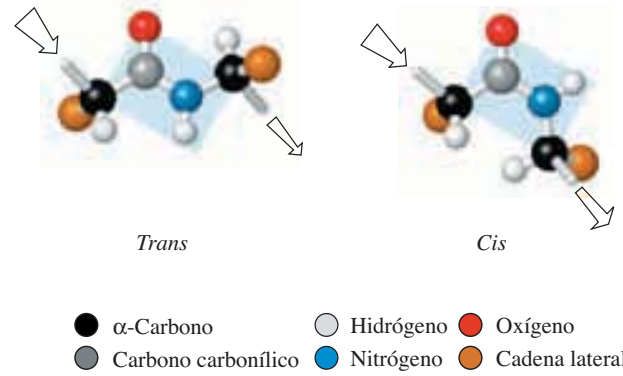
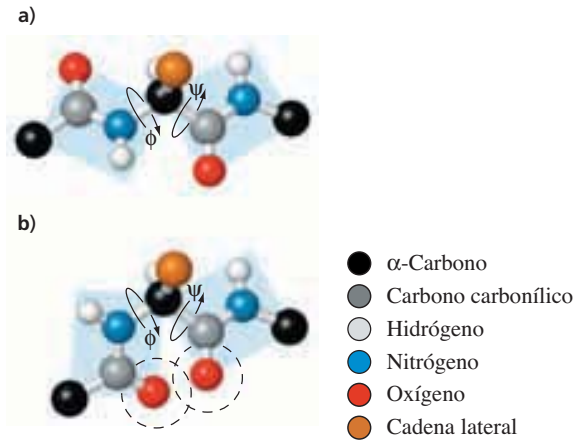


Figura 4.7 ▲
Conformaciones *trans y cis* de un grupo peptídico. Casi todos los grupos peptídicos en las proteínas tienen la conformación trans, lo que minimiza la interferencia estérica entre cadenas laterales adyacentes. Las flechas indican la dirección desde el N-terminal hasta el C.



◀ Figura 4.8
Rotación respecto a los enlaces N—C_α y C_α—C, que unen a los grupos peptídicos en una cadena de polipéptido. **a)** Grupos peptídicos en conformación extendida. **b)** Grupos peptídicos en conformación inestable debida a interferencia estérica entre oxígenos carbonílicos de residuos adyacentes. Los radios de van der Waals de los átomos de oxígeno carbonílico se indican con líneas entrecortadas. El ángulo de rotación en torno al enlace N—C_α se llama ϕ (fi) y el ángulo en torno al enlace C—C_α se llama ψ (psi). Los sustituyentes de los carbonos α externos se omitieron para mayor claridad.

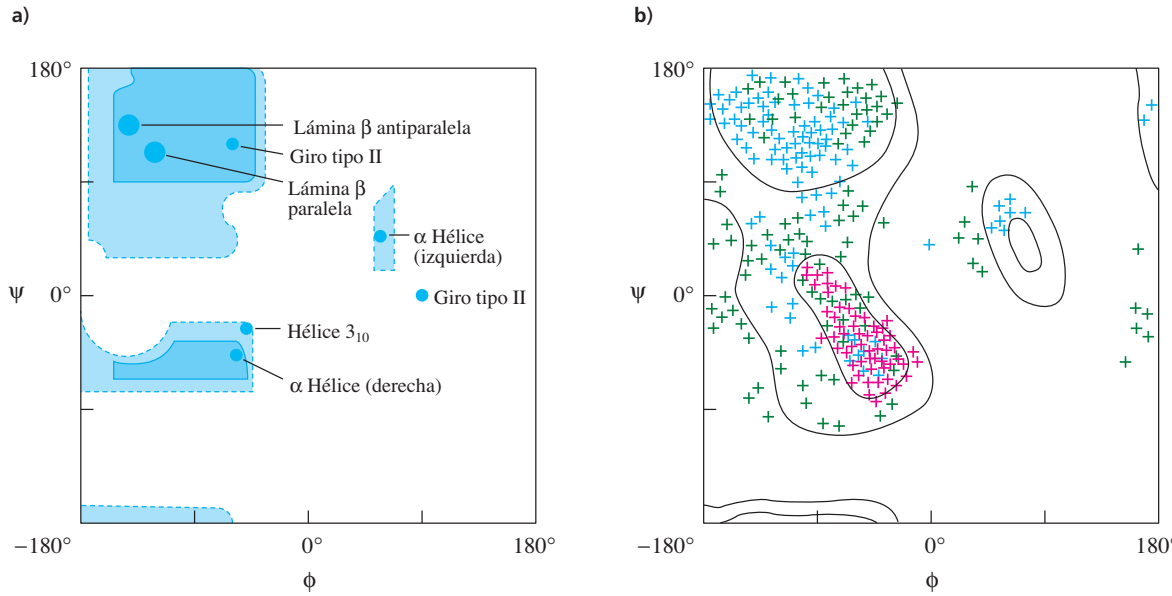


Figura 4.9 ▲
Diagrama de Ramachandran. **a)** Las líneas llenas indican los límites de valores permisibles de ϕ y ψ, de acuerdo con los modelos moleculares. Las líneas entrecortadas indican los límites externos de un residuo de alanina. Los puntos grandes corresponden a valores de ϕ y de ψ que producen conformaciones reconocibles, como la hélice α y las láminas β. Las posiciones que se indican para el giro tipo II son para el segundo y tercer residuos. Las partes blancas del diagrama corresponden a valores de ϕ y de ψ que se preveían presentarse rara vez. **b)** Valores observados de ϕ y de ψ en estructuras conocidas. Las cruces indican valores en residuos típicos en una sola proteína. Los residuos en una hélice α se muestran en rojo, y los residuos en las hebras β están en azul y otros más en verde.

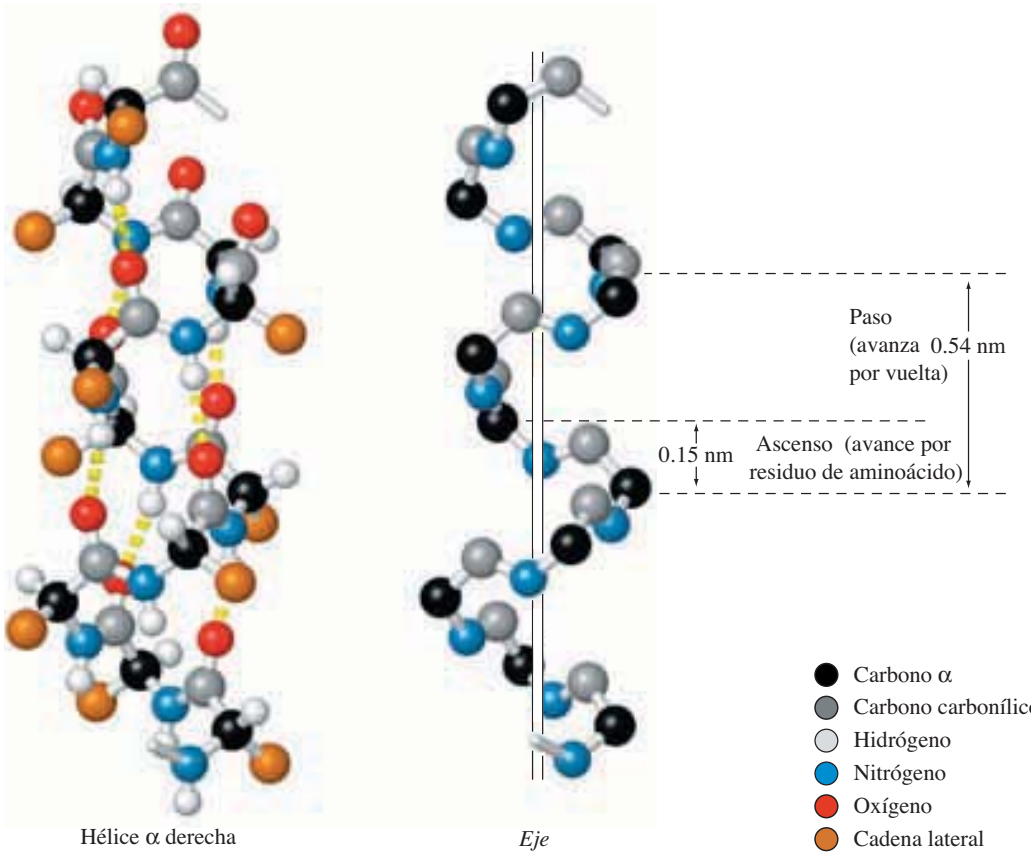
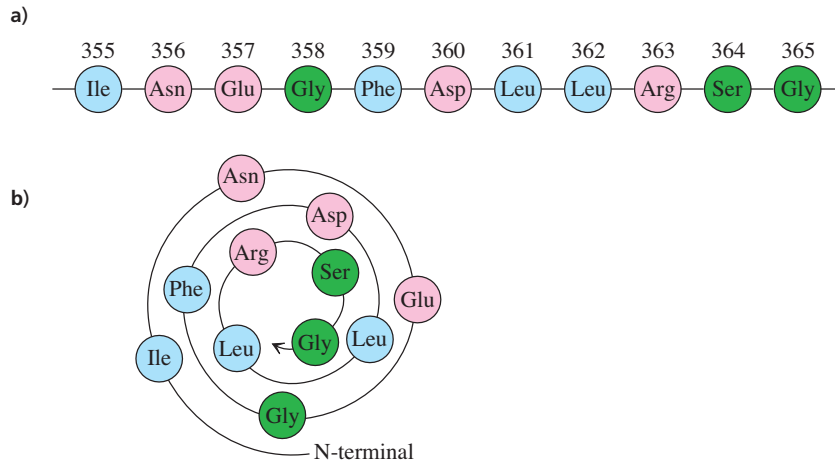
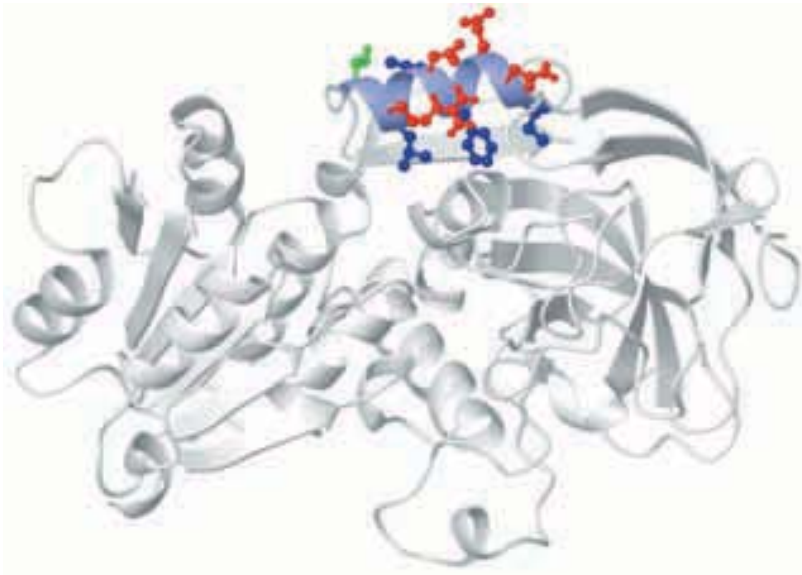


Figura 4.10 ▲
Hélice α. Se muestra una región de la estructura secundaria helicoidal α con el N-terminal en la parte inferior y el C-terminal en la parte superior de la figura. Cada oxígeno carbonílico forma un puente de hidrógeno con el hidrógeno de amida en el cuarto residuo hacia el C-terminal de la cadena de polipéptido. Los puentes de hidrógeno son aproximadamente paralelos al eje mayor de la hélice. Nótese que los grupos carbonilo apuntan hacia el C-terminal. En una hélice α ideal, las posiciones equivalentes se repiten cada 0.54 nm (el paso de la hélice), cada residuo de aminoácido avanza la hélice en 0.15 nm a lo largo de la hélice (el ascenso), y hay 3.6 residuos de aminoácidos por cada vuelta. En una hélice derecha, la columna vertebral gira en dirección de las manecillas del reloj, vista desde su N-terminal, a lo largo del eje. Si el lector imagina que la hélice derecha es una escalera de caracol, al bajar por ella estará girando hacia la derecha.

Figura 4.12 ▶
Hélice en la deshidrogenasa alcohólica de hígado de caballo. Los residuos muy hidrofóbicos están en azul, los menos hidrofóbicos están en verde, y los residuos muy hidrofílicos están en rosa. **a)** Secuencia de aminoácidos. **b)** Diagrama de rueda helicoidal.





◀ Figura 4.13
Deshidrogenasa alcohólica de hígado de caballo. Se destaca la hélice α anfipática. Las cadenas laterales de los residuos muy hidrofóbicos se representan en azul, los residuos menos hidrofóbicos son verdes, y los residuos con carga se muestran en rojo. Nótese que las cadenas laterales de los residuos hidrofóbicos se dirigen hacia el interior de la proteína, y que las cadenas laterales de los residuos cargados quedan expuestas en la superficie. [PDB 1ADF].

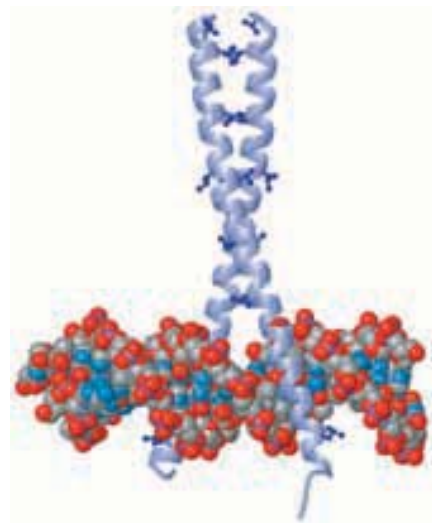


Figura 4.14 ▲
Región de cremallera en leucina de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), proteína GCN4 unida al ADN. La GCN4 es una proteína reguladora de trascripción que se une con secuencias específicas de ADN. La región de unión con ADN consiste en dos hélices α anfipáticas, una de cada una de las dos subunidades de la proteína. Las cadenas laterales de los residuos de leucina se muestran en un azul más oscuro que la cinta. En esta figura sólo se muestra la región de la cremallera en la proteína. [PDB 1YSA].

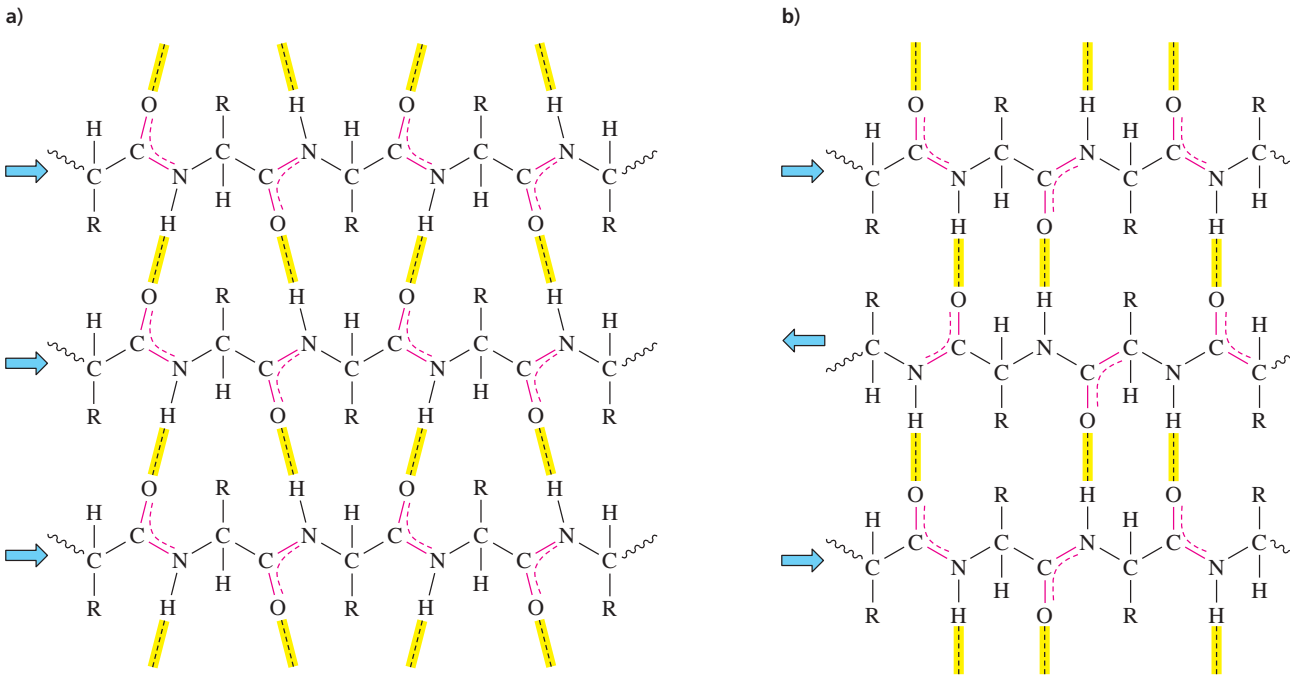


Figura 4.15 ▲
Láminas β. Las flechas indican la dirección desde el N hasta el C-terminales de la cadena del péptido. **a)** Lámina β paralela. Los puentes de hidrógeno están a distancias uniformes, pero están inclinados. **b)** Lámina β antiparalela. Los puentes de hidrógeno son esencialmente perpendiculares a las cadenas β y el espacio entre los pares unidos por puentes de hidrógeno es ancho y angosto en forma alternada.

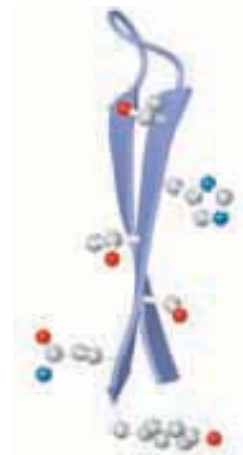


Figura 4.16 ▲
Dos hebras de una lámina β antiparalela de neuraminidasa del virus A de influenza. Sólo se muestran las cadenas laterales de la hebra β delantera. Las cadenas laterales se alternan de uno a otro lado de la hebra β. Ambas hebras tienen un giro derecho. [PDB 1BJI].

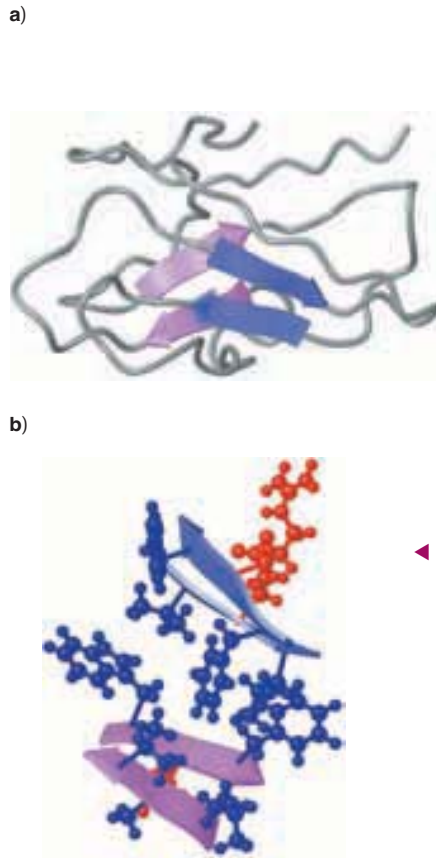


Figura 4.17
Estructura de PHL P2 de polen de pasto Timothy (*Phleum pratense*). **a)** Las dos cortas láminas de doble hebra β antiparalelas se destacan en azul y púrpura para mostrar su orientación dentro de la proteína. **b)** Estructura de emparedado β en una orientación distinta mostrando residuos hidrofóbicos (azul) y polares (rojo). Varias interacciones hidrofóbicas conectan las dos láminas β. [PDB 1BMW].

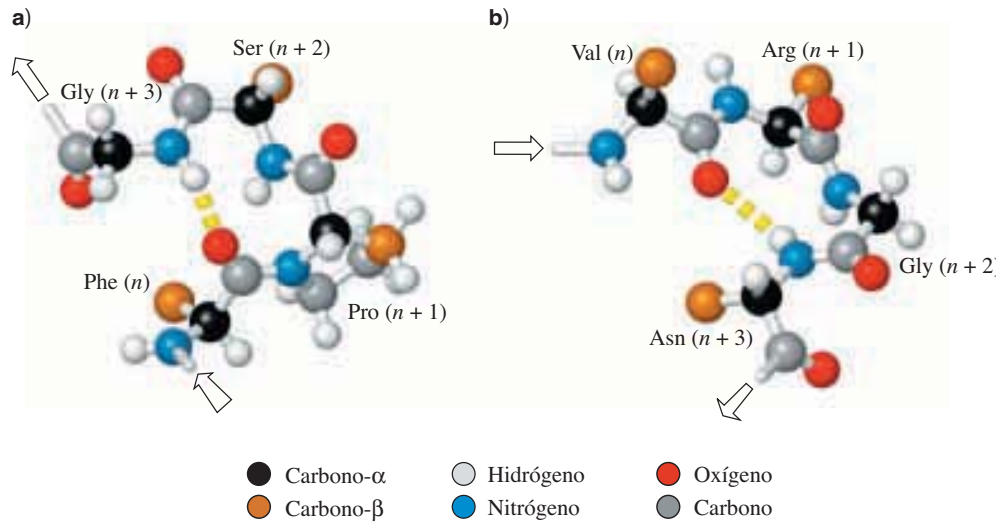
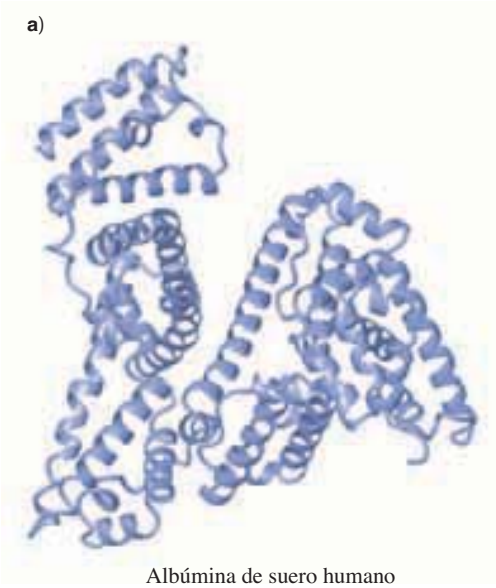


Figura 4.18 ▲▲
Giros inversos. **a)** Giro tipo I β. La estructura se halla estabilizada por un puente de hidrógeno entre el oxígeno carbonílico del primer residuo N-terminal (Phe) y el hidrógeno de amida del cuarto residuo (Gly). Obsérvese el residuo de prolina en la posición $n + 1$. **b)** Giro tipo II β. También está estabilizado por un puente de hidrógeno entre el oxígeno carbonílico del primer residuo N-terminal (Val) y el hidrógeno de amida del cuarto residuo (Asn). Obsérvese que el residuo de glicina está en la posición $n + 2$ [PDB 1AHL (neurotoxina de anémona marina gigante)].



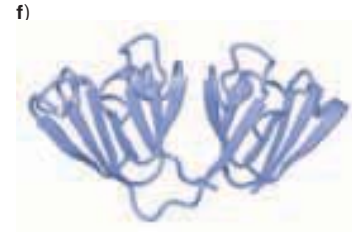
Albúmina de suero humano

Citocromo b_{562} de *E. coli*

Aciltransferasa de UDP *N*-acetylglucosamine de *E. coli*

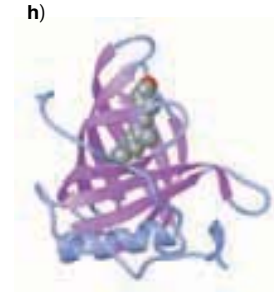
Concanavalina A de frijol Jack

Isomerasa humana de peptidilprolilo *cis*/*trans*



Gamma cristalina de vaca

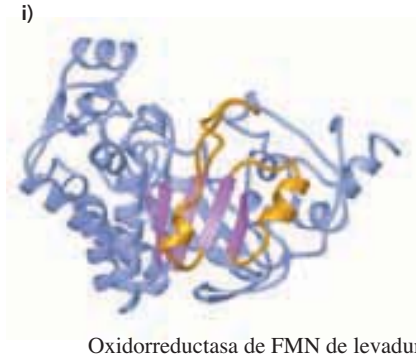
Proteína fluorescente verde de medusa



Proteína enlazante de retinol del cerdo

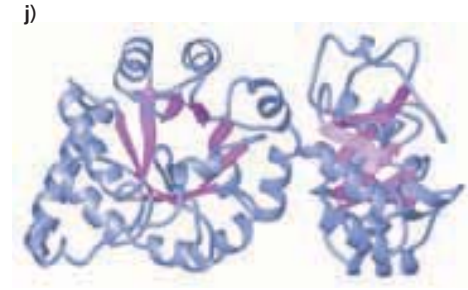
Figura 4.23 ▲
Ejemplos de estructuras terciarias de algunas proteínas. **a)** Albúmina de suero humano (*Homo sapiens*) [PDB 1BJ5] (clase: toda α). Esta proteína tiene varios dominios que consisten en hélices α estratificadas y haces de hélices. **b)** Citocromo b_{562} de *Escherichia coli* [PDB 1QPU] (clase: toda α). Es una proteína enlazante de hemo formada por un solo dominio de haz de cuatro hélices. **c)** Aciltransferasa de UDP *N*-acetilglucosamina de *Escherichia coli* [PDB 1LXA] (clase: toda β). La estructura de esta enzima es un ejemplo clásico de un dominio de hélice β. **d)** Concanavalina A de frijol (*Canavalia ensiformis*) [PDB 1CON] (clase: toda β). Esta proteína enlazante de carbohidrato (lectina) es de dominio único y está formada por un doblez grande en emparedado β. **e)** Isomerasa humana de peptidilprolilo *cis/trans* (*Homo sapiens*) [PDB 1VBS] (clase: toda β). La característica dominante de la estructura es un doblez en emparedado β. **f)** γ-Cristalina de vaca (*Bos taurus*) [PDB 1A45] (clase: toda β). Esta proteína contiene dos dominios en barril β. **g)** Proteína verde fluorescente de medusa (*Aequorea victoria*) [PDB 1GFL] (clase: toda β). Es una estructura de barril β con una hélice β central. Las hebras de la lámina son antiparalelas. **h)** Proteína enlazante de retinol del cerdo (*Sus scrofa*) [PDB 1AQB] (clase: toda β). El retinol se une en el interior de un pliegue de barril β. **i)** Enzima amarilla antigua de levadura de cerveza (*Saccharomyces carlburgensis*) (oxidorreductasa de FMN) [PDB 1OYA] (clase: α/β). El pliegue central es un barril α/β con hebras β paralelas unidas por hélices α. Hay dos regiones de conexión de hélice α resaltadas en amarillo. **j)** Enzima de *Escherichia coli* necesaria en la biosíntesis de triptófano [PDB 1PII] (clase: α/β). Esta enzima bifuncional contiene dos dominios distintos. Cada dominio es un ejemplo de barril α/β. El dominio izquierdo contiene la actividad de la sintetasa de indol-glicerol fosfato y el dominio derecho contiene la actividad de la isomerasa de fosforribosilantranilato.

i)



Oxidorreductasa de FMN de levadura (enzima amarilla antigua)

j)



Enzima de biosíntesis de triptófano de *E. coli*

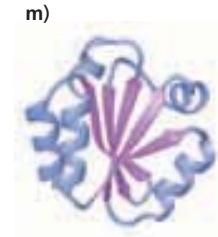
k)

Cinasa de adenililo de cerdo

l)

Flavodoxina de *E. coli*

m)

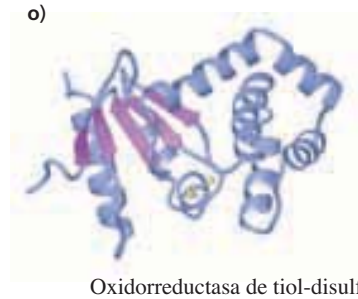


Tiorredoxina humana

n)

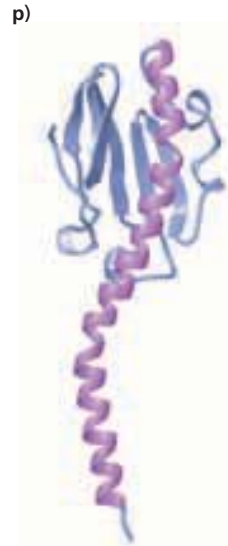
Proteína enlazante de L-arabinosa de *E. coli*

o)



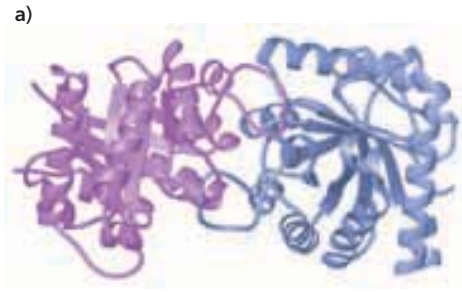
Oxidorreductasa de tiol-disulfuro de *E. coli*

p)

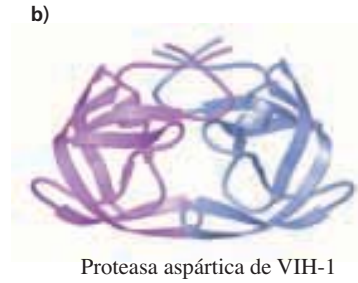


Pilina de *Neisseria gonorrhea*

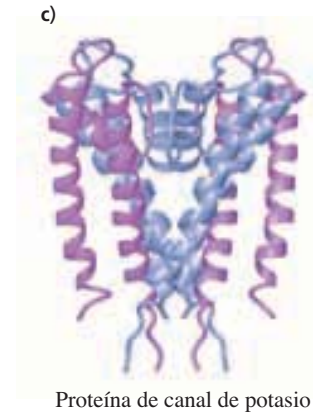
k) Cinasa de adenilato de cerdo (*Sus scrofa*) [PDB 3ADK] (clase: α/β). Esta proteína de un solo dominio consiste en una lámina paralela β de cinco hebras, con capas de hélices α arriba y abajo de ella. El sustrato se une en la marcada ranura que hay entre las hélices α. **l)** Flavodoxina de *Escherichia coli* [PDB 1AHN] (clase: α/β). El pliegue es una lámina paralela de cinco hebras torcida y rodeada por hélices α. **m)** Tiorredoxina humana (*Homo sapiens*) [PDB 1ERU] (clase: α/β). La estructura de esta proteína se parece mucho a la de la flavodoxina de *E. coli* pero la lámina torcida de cinco hebras en el pliegue de tiorredoxina contiene una sola hebra antiparalela. **n)** Proteína enlazante a L-arabinosa de *Escherichia coli* [PDB 1ABE] (clase: α/β). Es una proteína con dos dominios donde cada dominio se parece a la flavodoxina de *E. coli.* El azúcar L-arabinosa se une en la cavidad que hay entre los dos dominios. **o)** DsbA (oxidorreductasa de tiol-disulfuro-/isomerasa de disulfuro) de *Escherichia coli* [PDB 1A23] (clase: α/β). La característica predominante de esta estructura es una lámina β (casi toda) antiparalela emparedada entre dos hélices α. Se muestran cadenas laterales de cisteína en el extremo de una de las hélices α (los átomos de azufre están en amarillo). **p)** Pilina de *Neisseria gonorrhea* [PDB 2PIL] (clase: $\alpha + \beta$). Este polipéptido es una de las subunidades de las fimbrias en la superficie de la bacteria causante de la gonorrea. Hay dos regiones distintas de la estructura: una lámina β y una hélice α larga.



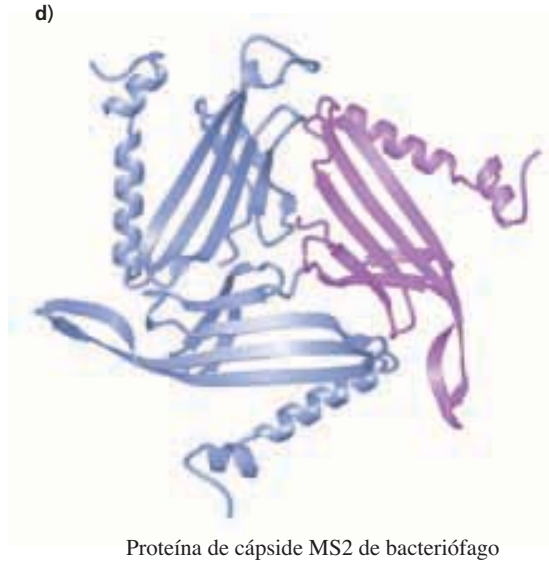
Isomerasa de triosa fosfato de pollo



Proteasa aspártica de VIH-1

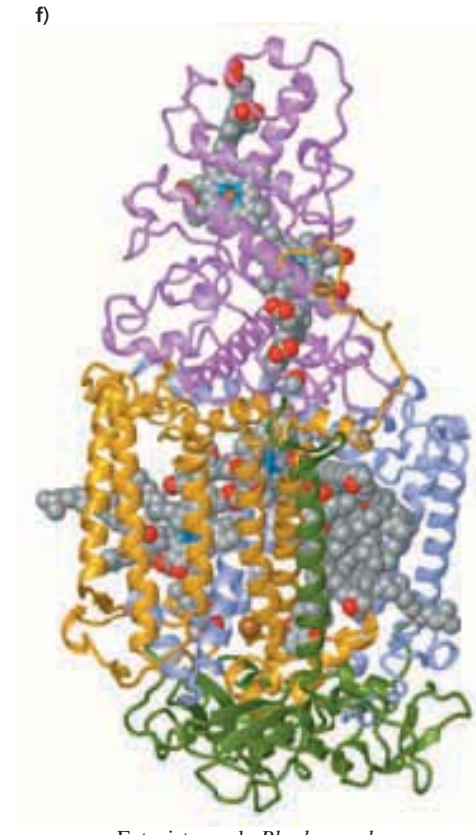


Proteína de canal de potasio de *Streptomyces*



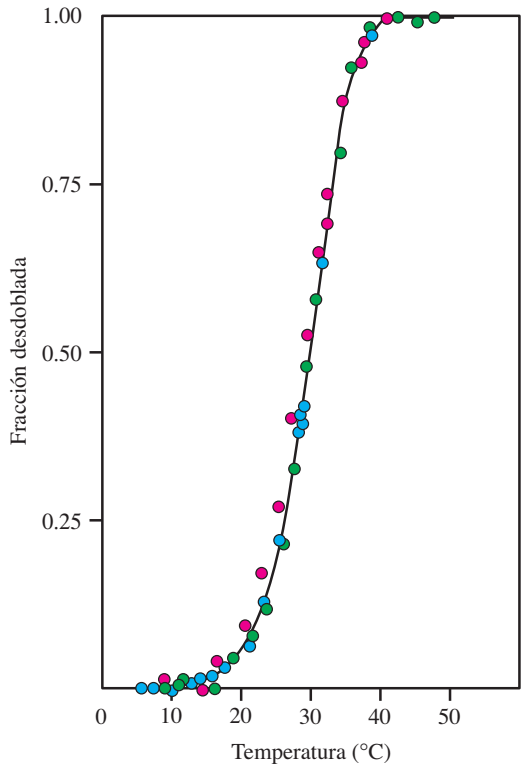
Proteína de cápside MS2 de bacteriófago

Transferasa humana de hipoxantina-guanina fosforribosilo



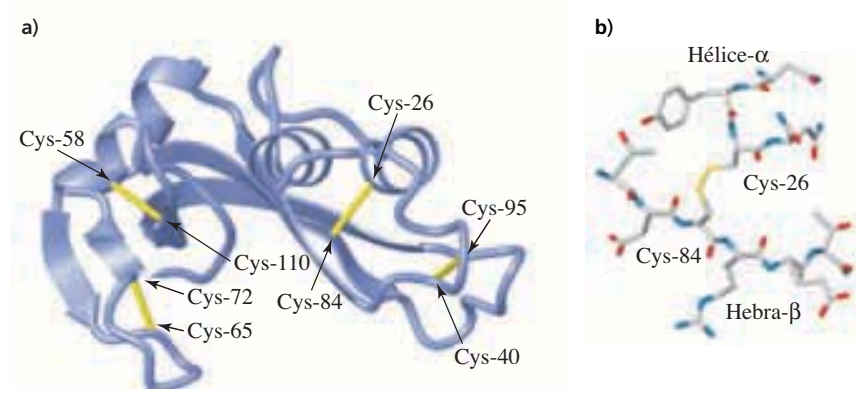
Fotosistema de *Rhodopseudomonas*

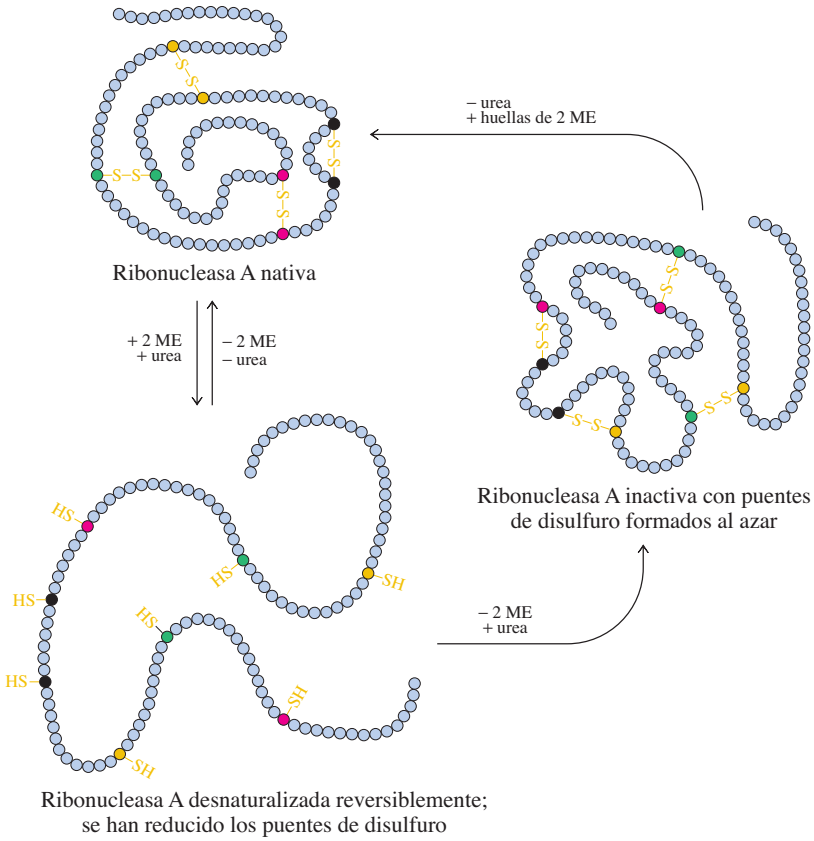
Figura 4.25 ▲
Estructura cuaternaria. **a)** Isomerasa de triosa fosfato de pollo (*Gallus gallus*) [PDB 1TIM]. Esta proteína tiene dos subunidades idénticas con pliegues de barril α/β. **b)** Proteasa aspártica de VIH-1 [PDB 1DIF]. Esta proteína tiene dos subunidades idénticas todas β que se unen en forma simétrica. La proteasa VIH es el objetivo de muchos medicamentos nuevos para el tratamiento de pacientes con SIDA. **c)** Proteína del canal de potasio de *Streptomyces lividans* [PDB 1BL8]. Esta proteína unida a la membrana tiene cuatro subunidades idénticas, cada una de las cuales contribuye con un haz de ocho hélices, que se esparce por la membrana. **d)** Proteína de cápside MS2 de bacteriófago [PDB 2MS2]. La unidad básica de la cápside MS2 es un trímero de dos subunidades idénticas con una lámina β grande. **e)** Transferasa humana de hipoxantina-guanina fosforribosilo (*Homo sapiens*) (HGPRT) [PDB 1BZY]. La HGPRT es una proteína tetramérica que contiene dos tipos distintos de subunidades. **f)** Fotosistema de *Rhodopseudomonas viridis* [PDB 1PRC]. Esta proteína compleja, unida a la membrana, tiene dos subunidades idénticas (naranja, azul) y otras dos subunidades (púrpura, verde) unidas a varias moléculas de pigmentos fotosintéticos.



◀ Figura 4.26
Calor de desnaturalización de la ribonucleasa A. Se calentó una solución de ribonucleasa A en KCl 0.02 M a pH 2.1. Se vigiló el desdoblado por cambios en absorbencia ultravioleta (azul), viscosidad (rojo) y rotación óptica (verde). [Adaptado de Ginsburg, A. y Carroll, W. R. (1965). Some specific ion effects on the conformation and thermal stability of ribonuclease. *Biochemistry* 4:2159-2174].

Figura 4.28 ▶
Puentes de disulfuro en ribonucleasa A bovina. **a)** Ubicación de los puentes de disulfuro en la proteína nativa. **b)** Vista del puente de disulfuro entre Cys-26 y Cys-84 [PDB 2A4S].





◀ Figura 4.29
Desnaturalización y renaturalización de ribonucleasa A. El tratamiento de la ribonucleasa A (arriba) con urea en presencia de 2-mercaptoetanol desdobla la proteína y rompe los puentes de disulfuro para producir ribonucleasa A reducida y desnaturalizada reversiblemente (abajo). Cuando la proteína desnaturalizada se regresa a las condiciones fisiológicas en ausencia de 2-mercaptoetanol, se vuelve a plegar y adquiere su conformación nativa y se forman los puentes de disulfuro correctos. Sin embargo, cuando sólo se elimina el 2-mercaptoetanol, la ribonucleasa A se vuelve a oxidar en presencia de aire, pero los puentes de disulfuro se forman al azar y producen una proteína inactiva (como la que se ve a la derecha). Cuando la urea se elimina, se agregan huellas de 2-mercaptoetanol a la proteína oxidada al azar y la solución se calienta suavemente, los puentes de disulfuro se rompen y se vuelven a formar correctamente, produciendo la ribonucleasa A nativa.

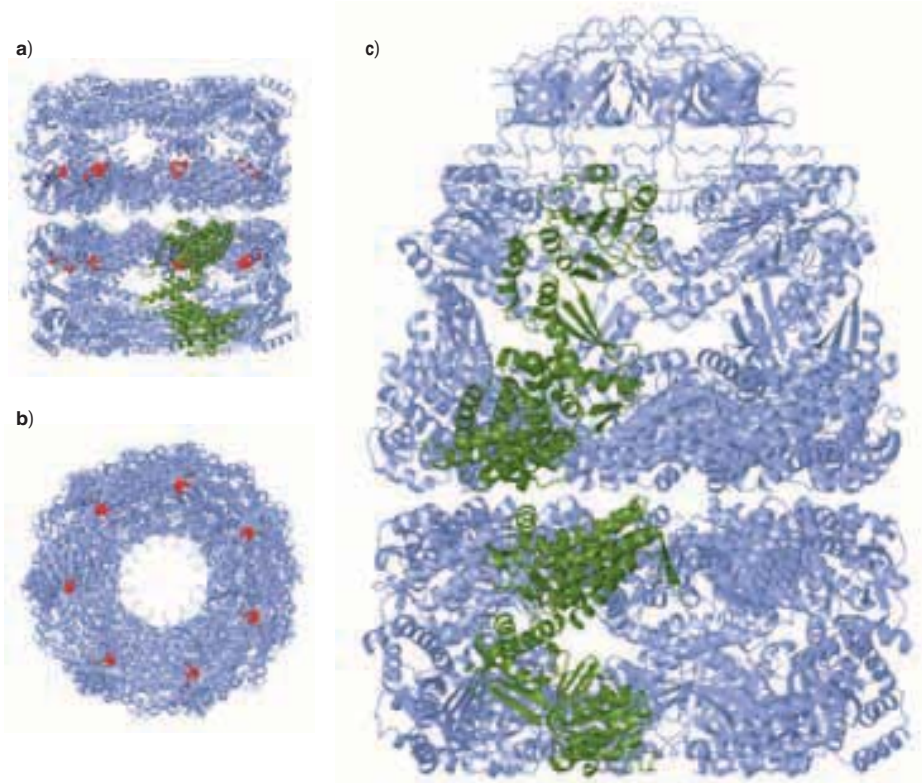


Figura 4.32 ▲
Chaperonina de *Escherichia coli* (GroE). La estructura nuclear consiste en dos anillos idénticos formados por siete subunidades de GroEL. Las proteínas desdobladas se unen a la cavidad central. Se pueden identificar las moléculas de ATP enlazadas por sus átomos de oxígeno rojos. **a)** Vista lateral. **b)** Vista superior mostrando la cavidad central. [PDB 1DER]. **c)** Durante el plegamiento aumenta el tamaño de la cavidad central de los anillos y el extremo se obtura con una proteína que contiene siete subunidades de GroES. [PDB 1AON].

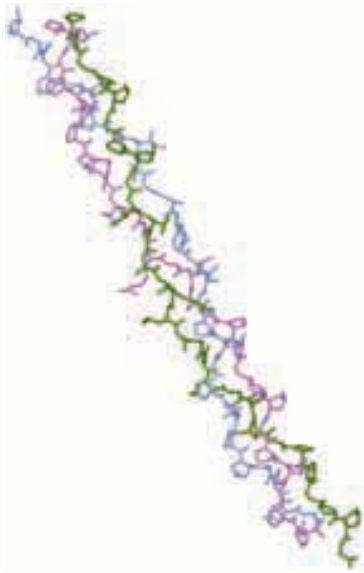


Figura 4.36 ▲
Triple hélice de colágena humana tipo III. La región extendida de colágena contiene tres subunidades idénticas (púrpura, azul claro y verde). Se enrollan entre sí tres hélices izquierdas de colágena y forman una superhélice derecha. [PDB 1BKV].

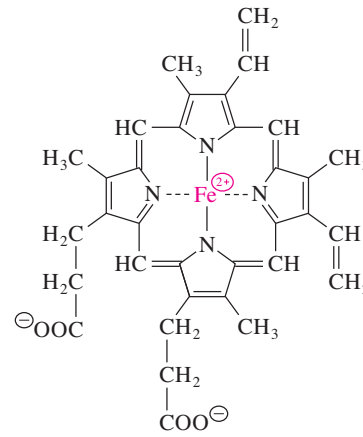


Figura 4.39 ▲
Estructura química del grupo hemo Fe(II)-protoporfirina en la mioglobina y la hemoglobina. El anillo de porfirina aporta cuatro de los seis ligandos que rodean al átomo de hierro.

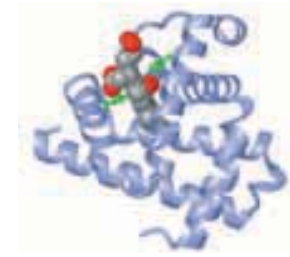
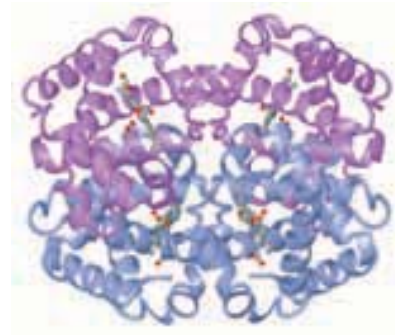


Figura 4.40 ▲
Oximioglobina de esperma de ballena (*Physeter catodon*). La mioglobina consiste en ocho hélices α. El grupo prostético hemo se une con oxígeno (rojo). La His-64 (verde) forma un puente de hidrógeno con el oxígeno, y la His-93 (verde) se acompleja con el átomo de hierro del hemo. [PDB 1A6M].

Figura 4.42 ▶
Oxihemoglobina humana (*Homo sapiens*). **a)** Estructura de la oxihemoglobina humana donde se ven dos unidades α y dos β. Los grupos hemo se muestran como modelos de palillos. [PDB 1HND]. **b)** Esquema del tetrámero de hemoglobina. Los grupos hemo están en rojo.

a)



b)

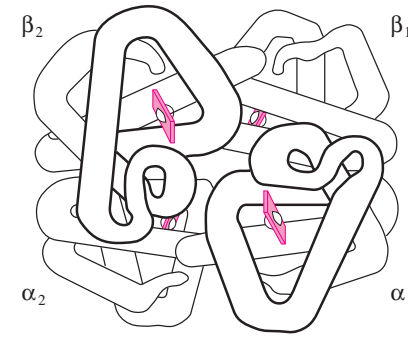
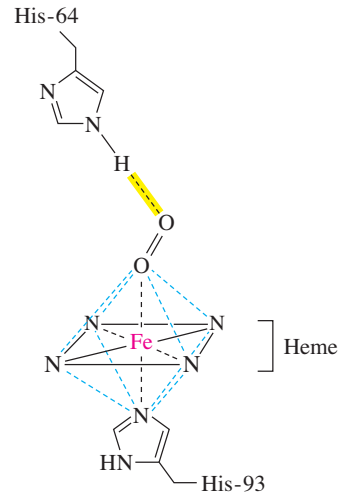


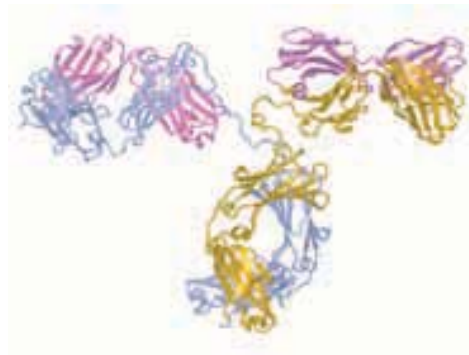
Figura 4.43 ▲
Estructura terciaria de la mioglobina, α-globina y β-globina. Las orientaciones de las subunidades individuales de α-globina y β-globina se han desplazado para exponer las semejanzas en la estructura terciaria. Se han eliminado los grupos hemo y se han sobrepuesto las tres estructuras. Todas las estructuras son de las formas oxigenadas en las figuras 4.40 y 4.42. Clave de colores: α-globina: azul, β-globina: púrpura y mioglobina: verde.



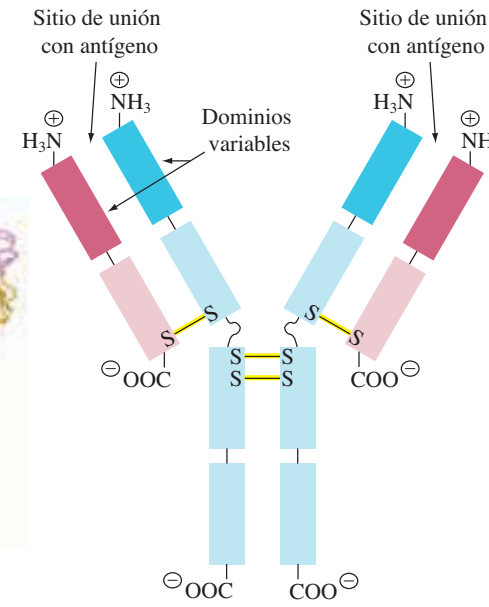
◀ **Figura 4.44**
Sitio de unión de oxígeno en la oximioglobina de esperma de ballena. El grupo prostético hemo se representa por un paralelogramo con un átomo de nitrógeno en cada vértice. Las líneas entrecortadas azules ilustran la geometría octaédrica del complejo de coordinación.

Figura 4.52 ▶
Estructura de un anticuerpo humano. **a)** Estructura. **b)** Diagrama. Dos cadenas pesadas (azul) y dos ligeras (rojo) de anticuerpos, de la clase inmunoglobulina G, se unen por puentes de disulfuro (amarillos). Los dominios variables de las cadenas ligera y pesada (donde se une el antígeno) tienen colores más oscuros.

a)



b)



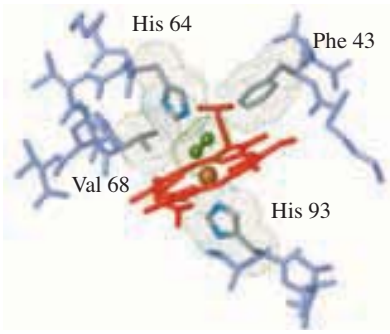
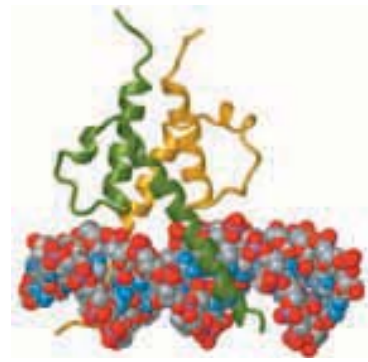


Figura 4.45 ▲
Sitio de enlace con oxígeno en la mioglobina de esperma de ballena. El Fe(II) (naranja) está en el plano del grupo hemo. El oxígeno (verde) se une al átomo de hierro, y la cadena lateral de aminoácido de His-64, Val-68 y Phe-43 aportan al ambiente hidrofóbico del sitio enlazante con oxígeno. [PDB 1AGM].

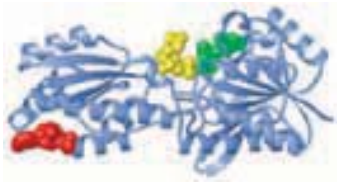


◀ Página 126

▲ Página 129

Arriba: La enzima acetilcolinesterasa, con el inhibidor reversible clorhidrato de donepecilo (Aricept, se muestra en rojo) ocupando el sitio activo. Se usa Aricept para mejorar las funciones mentales en pacientes con enfermedad de Alzheimer. Se cree que actúa inhibiendo la descomposición del neurotransmisor acetilcolina en el cerebro, prolongando así los efectos del neurotransmisor. (Sin embargo, no afecta el curso de la enfermedad). [PDB 1EVE].

a)



b)

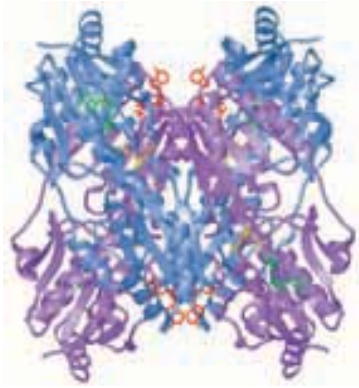
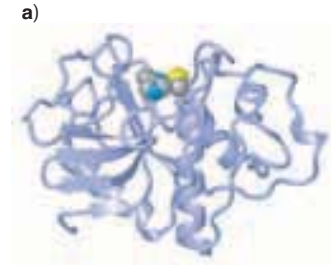


Figura 5.20▲
Conformación R de la fosfofructocinasa-1 de *E. coli*. La enzima es un tetrámero de cadenas idénticas. **a)** Una subunidad, representada por una cinta. Los productos, fructosa 1,6-*bi*fosfato (amarillo) y ADP (verde) están unidos en el sitio activo. El activador alostérico ADP (rojo) está enlazado en el sitio regulador. **b)** Tetrámero. Dos están en azul y dos en púrpura. Los productos, fructosa 1,6-*bi*fosfato (amarillo) y ADP (verde) están enlazados en los cuatro sitios activos. El ADP, activador alostérico (en rojo), está unido en los cuatro sitios reguladores en la interfase de las subunidades. [PDB 1PFK].

a)



b)

Figura 6.5▲
Residuos ionizables en la papaína. **a)** Modelo de la papaína, con modelos de esferas llenas para histidina y cisteína en el sitio activo. Los átomos de nitrógeno del imidazol están en azul y el átomo de azufre es amarillo. **b)** Estos dos residuos de sitio activo se unen a la columna vertebral de la proteína, que ha girado respecto de su posición en la parte (a). [PDB 1EFF].

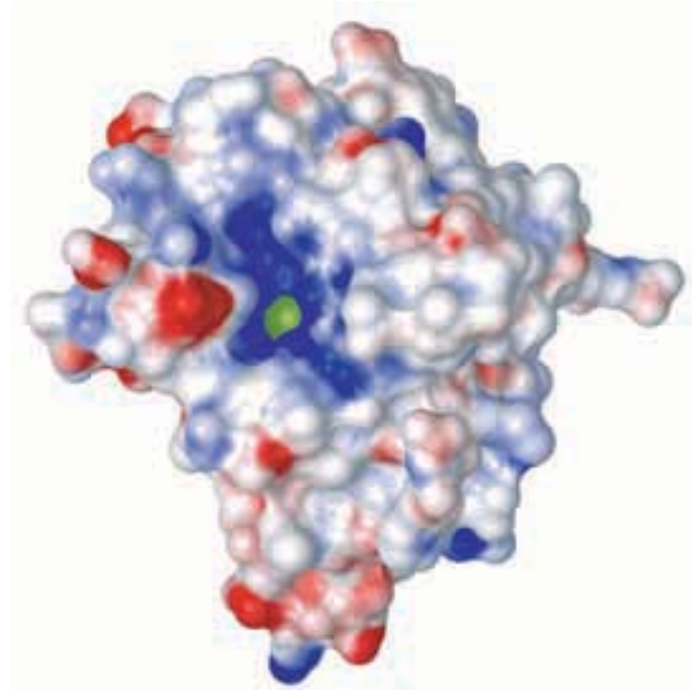


Figura 6.10 ▶
Carga en la superficie de la superóxido dismutasa humana. Se muestra la estructura de la enzima como un modelo para detallar la superficie de la proteína. Las regiones con carga positiva tienen color azul y las de carga negativa tienen color rojo. El átomo de cobre en el sitio activo es verde. Nótese que el canal que lleva al sitio de unión está recubierto con residuos hidrofílicos. [PDB 1HL5].

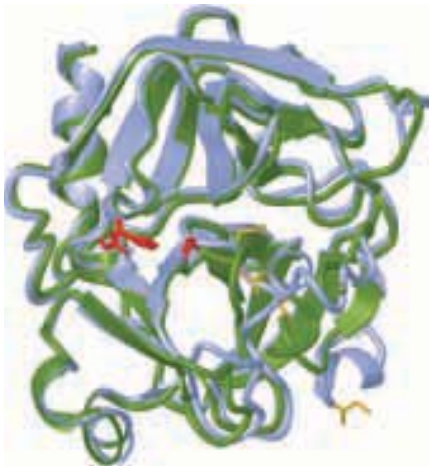
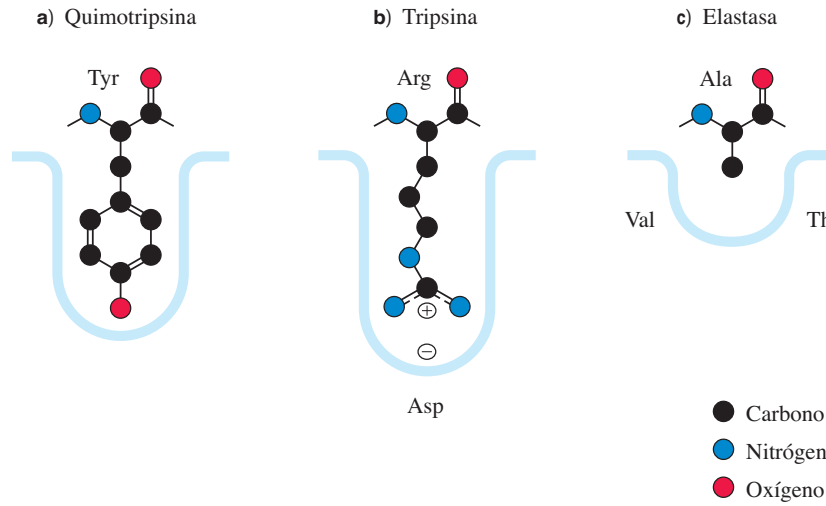
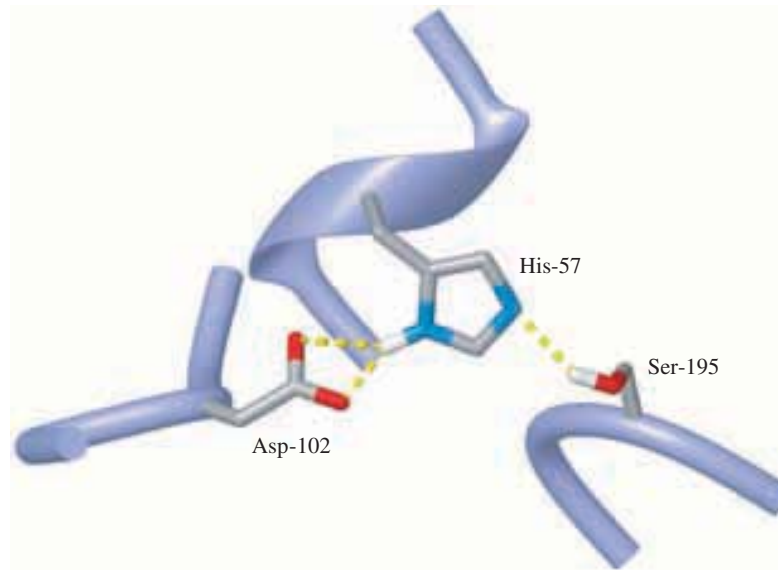


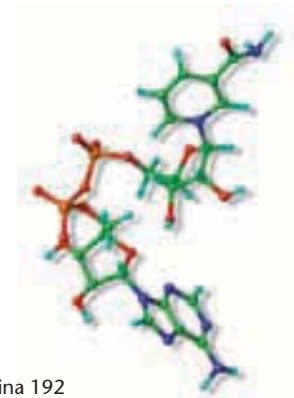
Figura 6.22 ▲
Cadenas de polipéptido del quimotripsinógeno (azul) [PDB 2CGA] y de α-quimotripsina (verde) [PDB 5CHA]. Los grupos Ile-16 y Asp-194 en el zimógeno y en la enzima activa se muestran en amarillo. Los residuos de sitio catalítico (Asp-102, His-57 y Ser-195) se muestran en rojo.



▲ **Figura 6.24**
Sitios de enlace de quimotripsina, tripsina y elastasa. Los distintos sitios de enlace de estas tres serina proteasas son determinantes primarios de sus especificidades hacia el sustrato. **a)** La quimotripsina tiene una hendidura o bolsa hidrofóbica que se une a las cadenas laterales de residuos de aminoácido aromático o grupos voluminosos. **b)** Un residuo de aspartato con carga negativa en el fondo de la bolsa de unión de la tripsina permite que ésta se enlace a las cadenas laterales con carga positiva de residuos de lisina y arginina. **c)** En la elastasa, las cadenas laterales de un residuo de valina y uno de treonina en el sitio de unión crean una hendidura o bolsa de enlace superficial. La elastasa sólo se une a residuos de aminoácido con cadenas laterales pequeñas, en especial de residuos de glicina y alanina.

Figura 6.25 ▶
El sitio activo de la quimotripsina. Los residuos del sitio activo, Asp-102, His-57 y Ser-195 se ordenan en una red de puentes de hidrógeno. La conformación de esos residuos es estabilizada por un puente de hidrógeno entre el oxígeno carbonilo de la cadena lateral de carboxilato en Asp-102, y el nitrógeno del enlace peptídico de His-57. Los átomos de oxígeno en los residuos de sitio activo están en rojo, y los átomos de nitrógeno en azul oscuro [PDB 5CHA].





▲ Página 192

Arriba: Nicotinamida adenina dinucleótido ($NAD^{\oplus}$), coenzima derivada de la vitamina ácido nicotínico (niacina). El $NAD^{\oplus}$ es un agente oxidante.

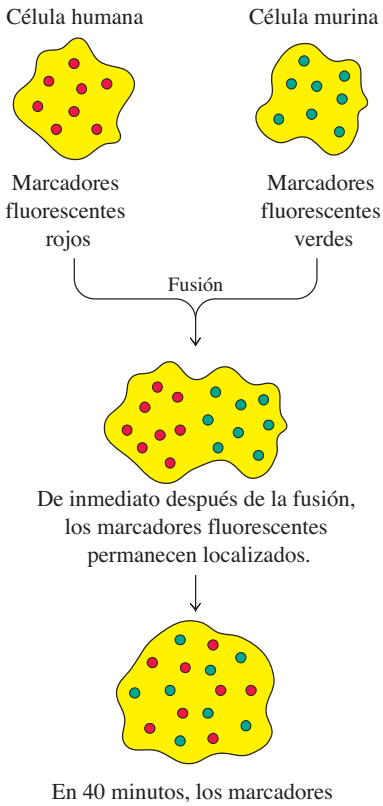
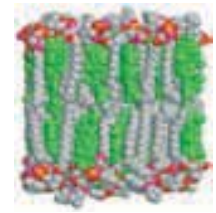


Figura 9.23 ▲
Difusión de proteínas de membrana. Células humanas cuyas proteínas de membrana marcadas con una sustancia fluorescente roja se fundieron con células de ratón, cuyas proteínas de membrana se habían marcado con una sustancia fluorescente verde. Los marcadores, al principio localizados, se dispersaron sobre toda la superficie de la célula fusionada en 40 minutos.



◀ Figura 9.26
Modelo de una membrana lipídica que contiene moléculas de colesterol y de fosfolípidos. Obsérvese el denso empacamiento del colesterol y las largas cadenas saturadas de los grupos acilo graso. Las moléculas de colesterol se muestran en color verde.

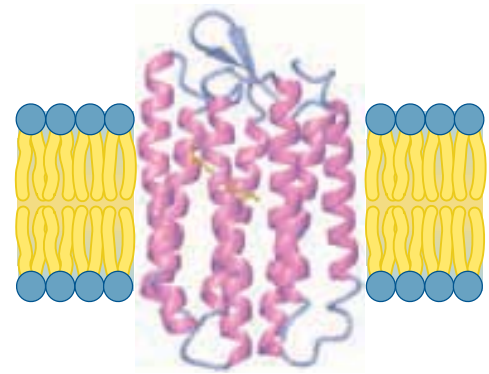
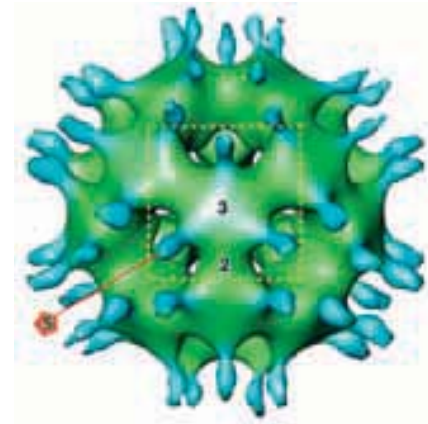


Figura 9.27 ▲
Bacteriorrodopsina de *Halobacterium salinarum*. Siete α hélices que abarcan la membrana, unidas por bucles, forman un haz que abarca la bicapa. El grupo prostético de captación de luz se ve en amarillo. [PDB 1FBB].

a)



b)

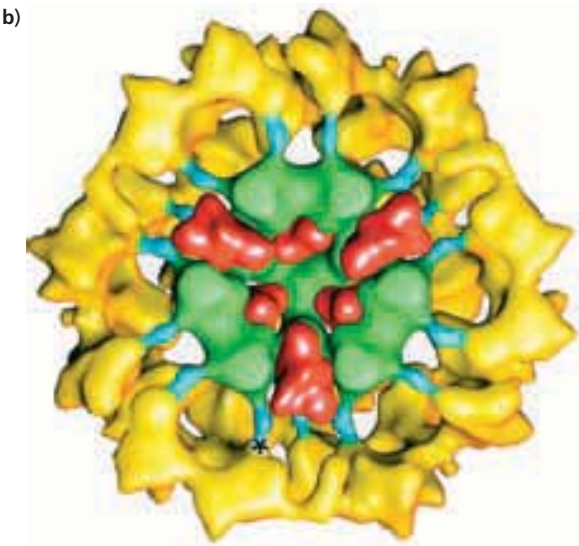
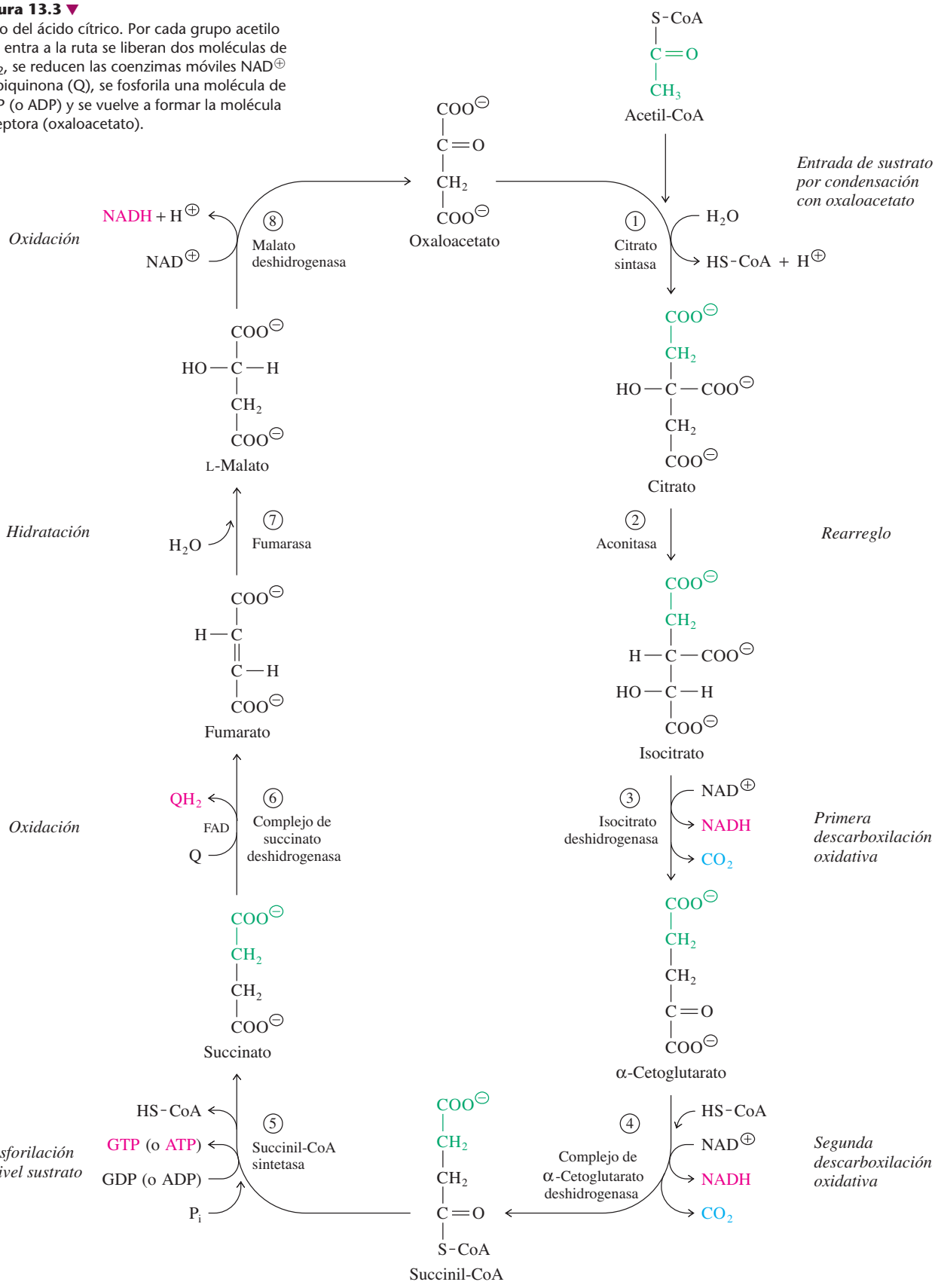


Figura 13.2 ▶
Modelo estructural del complejo de piruvato deshidrogenasa. **a)** El núcleo interno consiste en 60 enzimas E_2 ordenadas en la forma de un dodecaedro pentagonal, con un trímero E_2 en cada uno de los 20 vértices. Se indica un solo trímero con un marcador amarillo. El centro de la forma pentagonal se indica con el pentágono rojo. Nótense las regiones de enlazamiento que sobresalen hacia arriba, desde la superficie de la estructura nuclear. **b)** Corte del complejo completo, mostrando las enzimas exteriores E_1 (amarillo) y las enzimas BP-E_3 (rojo) ubicadas en el espacio entre las enzimas E_2 del núcleo interno. [Según Zhou, H. Z. et al. (2001). The remarkable structural and functional organization of the eukaryotic pyruvate dehydrogenase complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (USA) 98, 14082-14087].

Figura 13.3 ▼
Ciclo del ácido cítrico. Por cada grupo acetilo que entra a la ruta se liberan dos moléculas de CO_2, se reducen las coenzimas móviles $NAD^{\oplus}$ y ubiquinona (Q), se fosforila una molécula de GDP (o ADP) y se vuelve a formar la molécula receptora (oxaloacetato).



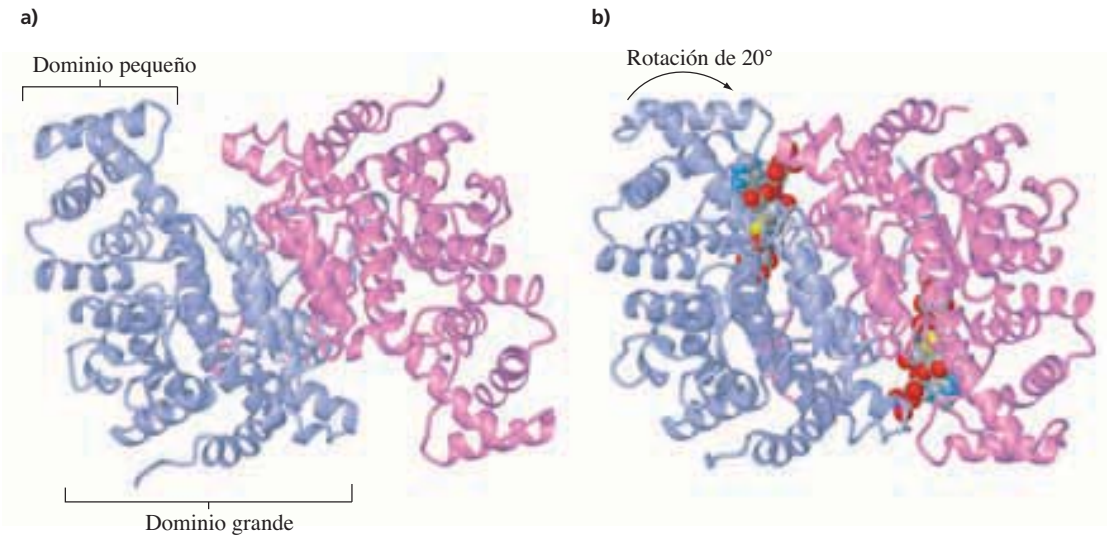
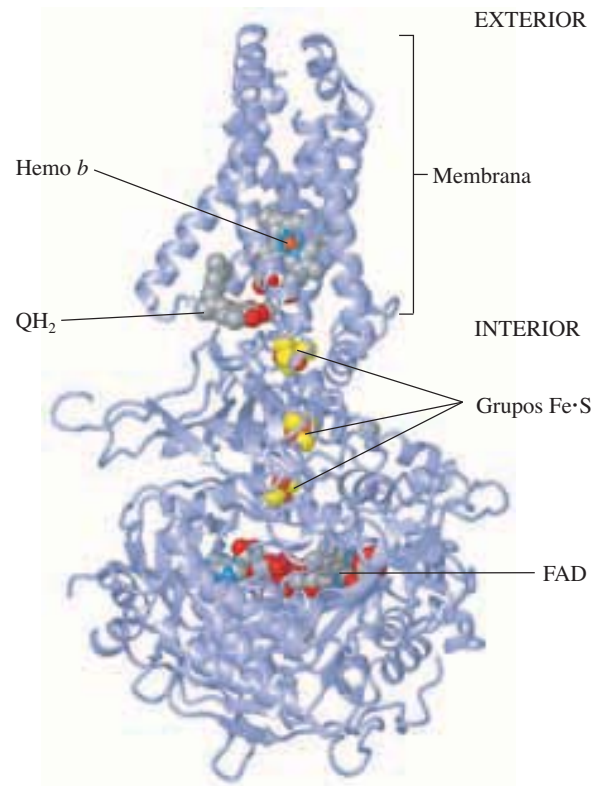


Figura 13.6 ▲
Citrato sintasa de pollo. Las dos subunidades idénticas tienen colores azul y púrpura. Cada una está formada por un dominio pequeño y uno grande. **a)** Conformación abierta. El sitio de enlazamiento del sustrato está en la profunda hendidura entre el dominio pequeño de una unidad y el dominio grande de la otra. [PDB 5CSC]. **b)** Conformación cerrada. El dominio pequeño se ha desplazado en relación con el grande, para cerrar la gran hendidura de enlazamiento que se ve en la conformación abierta. Los análogos del sustrato se muestran como modelos tridimensionales. [PDB 6CSC].

Figura 14.8 ▶
Estructura del complejo de succinato deshidrogenasa en *E. coli*. Una sola copia de la enzima muestra las posiciones de FAD, los tres grupos Fe-S, QH_2 y el grupo hemo *b*. El complejo II contiene tres copias de esta enzima de varias subunidades. [PDB 1NEK].



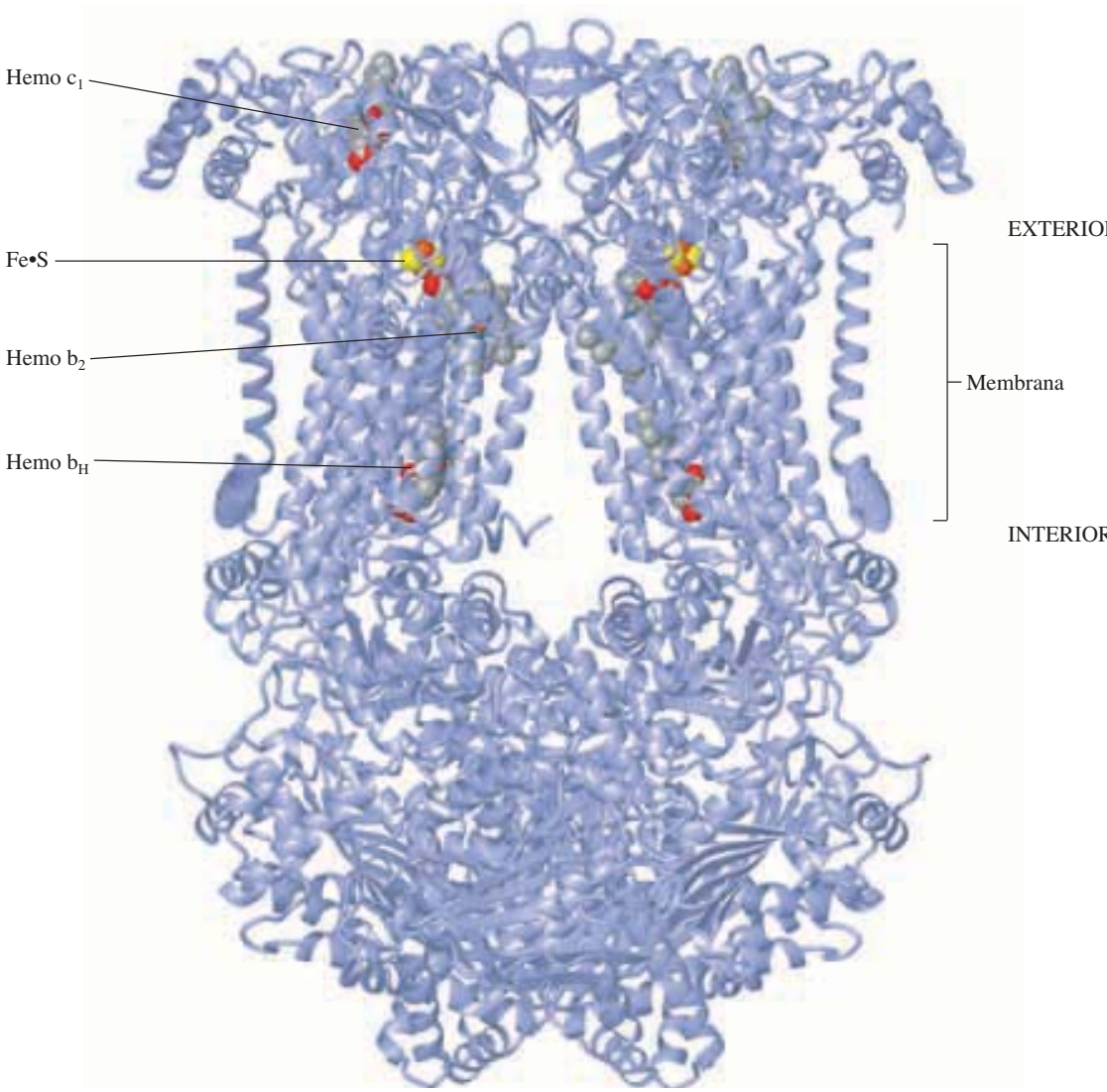


Figura 14.10 ▲
Complejo III de mitocondrias de vaca (*Bos taurus*). El complejo contiene dos copias de la enzima ubiquinona:citocromo *c* oxidorreductasa. [PDB 1PP9].

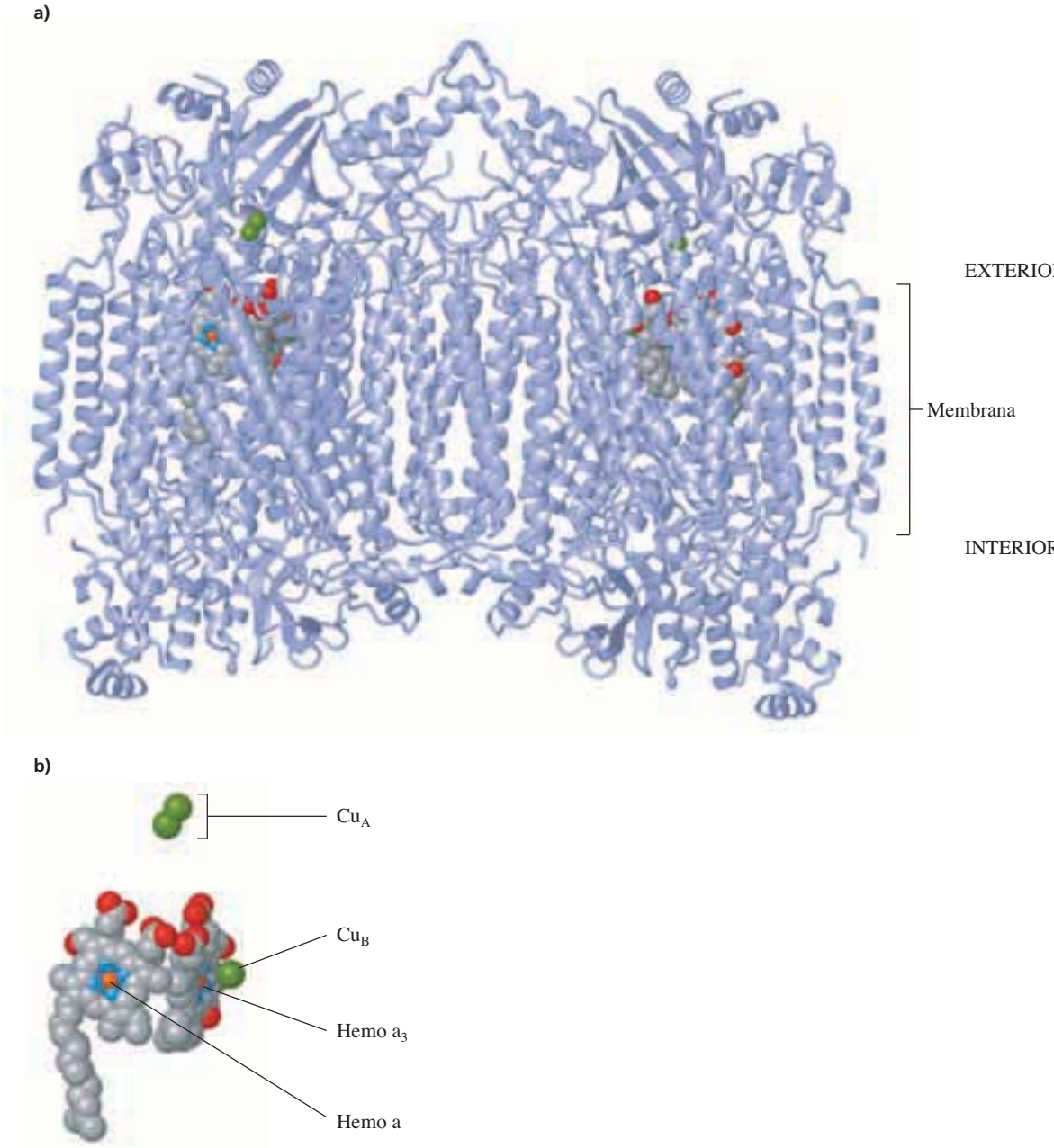
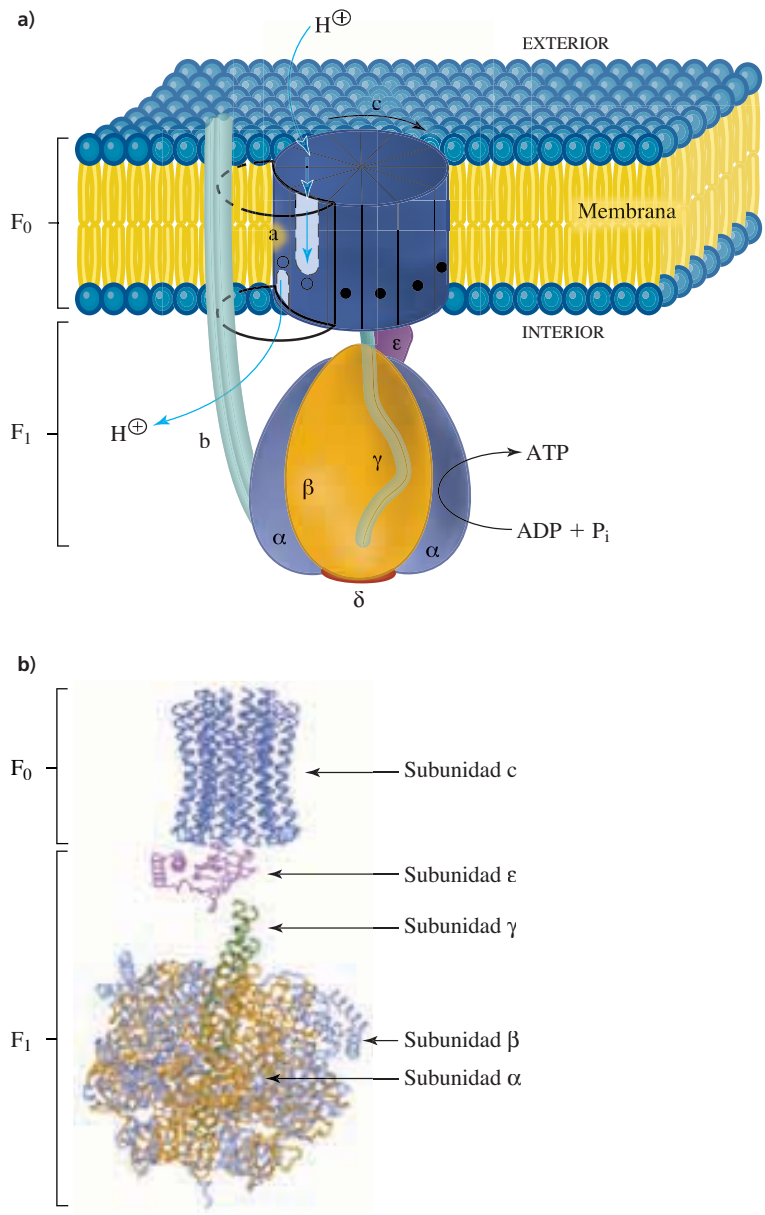


Figura 14.12 ▲
Estructura del complejo IV de vaca (*Bos taurus*) en las mitocondrias. **a)** El complejo IV está formado por dos unidades funcionales de citocromo *c* oxidasa. Cada unidad está formada por 13 subunidades con múltiples α-hélices que abarcan a la membrana. **b)** Organización de los cofactores hemo y cobre en una de las unidades de citocromo *c* oxidasa. [PDB 1OCC].



◀ Figura 14.14
Estructura de manija y tallo de la ATP sintasa. **a)** El componente F_1 está en la cara interna de la membrana. El componente F_0, que abarca la membrana, forma un canal de protones en la interfase a-c. El paso de protones por este canal hace que gire el rotor (sombreado) en relación con el estator. El giro de esas rotaciones se transmite a F_1 donde se usa para impulsar la síntesis de ATP. **b)** Estructura molecular del rotor y parte del estator de la ATP sintasa en *Saccharomyces cerevisiae*. El estudio de muchas estructuras moleculares como ésta, basado en cristalografía de rayos X, ayudó a deducir el modelo completo que se ve en (a). [PDB 1QO1].

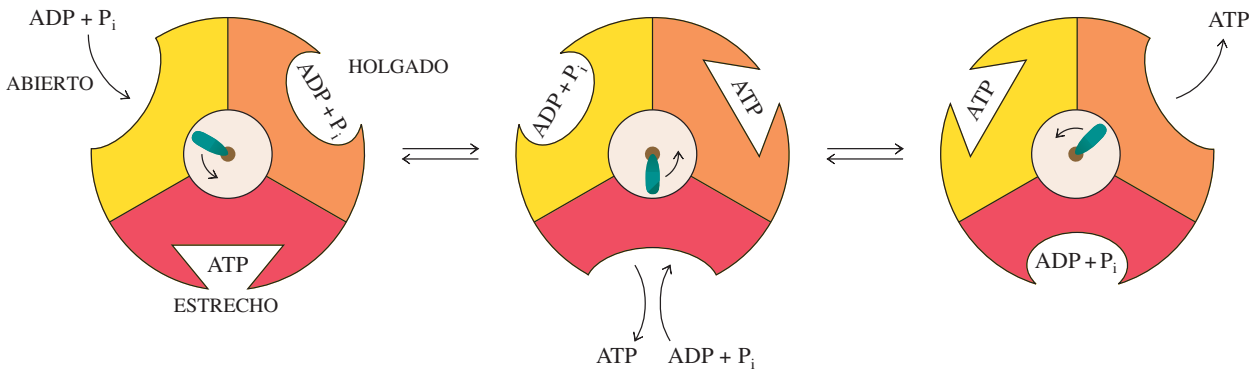
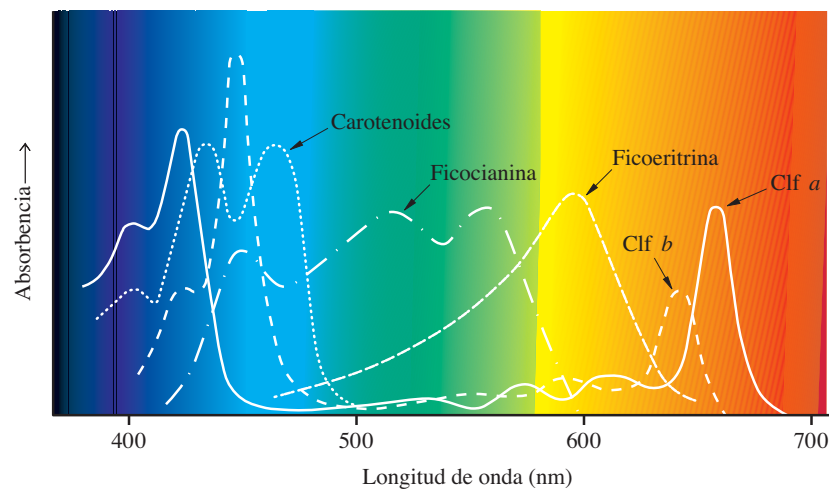


Figura 14.15 ▲
Mecanismo de cambio de enlazamiento en la ATP sintasa. Las diversas conformaciones de los tres sitios catalíticos se indican con formas diferentes. El ADP y el P_i se unen al sitio amarillo en la conformación abierta, cuando el eje γ gira en dirección contraria a las manecillas del reloj (vista del extremo citoplásmico/matriz del componente F_1), el sitio amarillo se convierte en una conformación holgada donde el ADP y el P_i se enlazan con más fuerza. Después del paso siguiente de la rotación, el sitio amarillo se convierte en una conformación estrecha, y se sintetiza ATP. Mientras tanto, el sitio que tenía fuertemente unido al ATP se ha vuelto un sitio abierto, y un sitio holgado que contiene otras moléculas de ADP y P_i transformándose en un sitio estrecho. El ATP es liberado del sitio abierto, y el ATP es sintetizado en el sitio estrecho.

Figura 15.2 ▶
Espectros de absorción de los principales pigmentos fotosintéticos. En conjunto, los pigmentos absorben energía radiante de todo el espectro de la luz visible.



◀Página 447
Octubre en el noroeste de Vermont. Los colores otoñales de las hojas se deben, en parte, a la presencia de los pigmentos accesorios que se vuelven visibles cuando se degradan las moléculas de clorofila al morir las hojas. Algunos de los colores más brillantes se deben a las antocianinas.

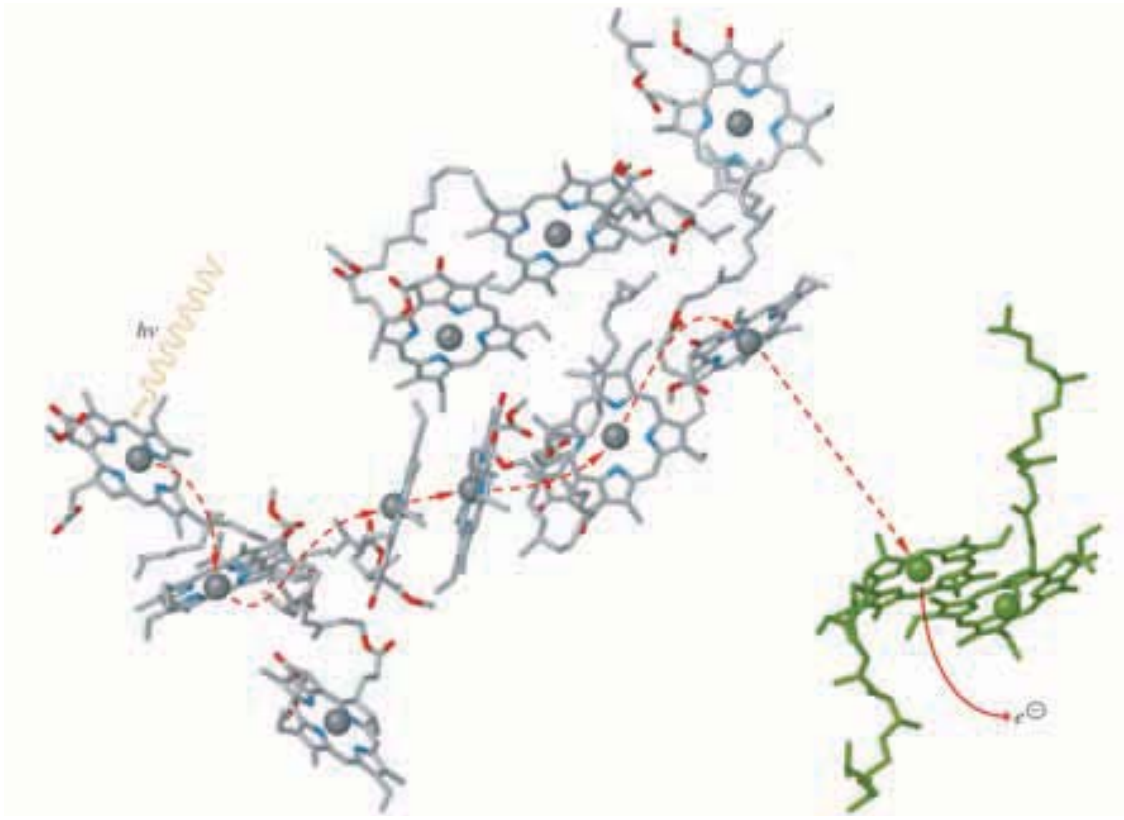
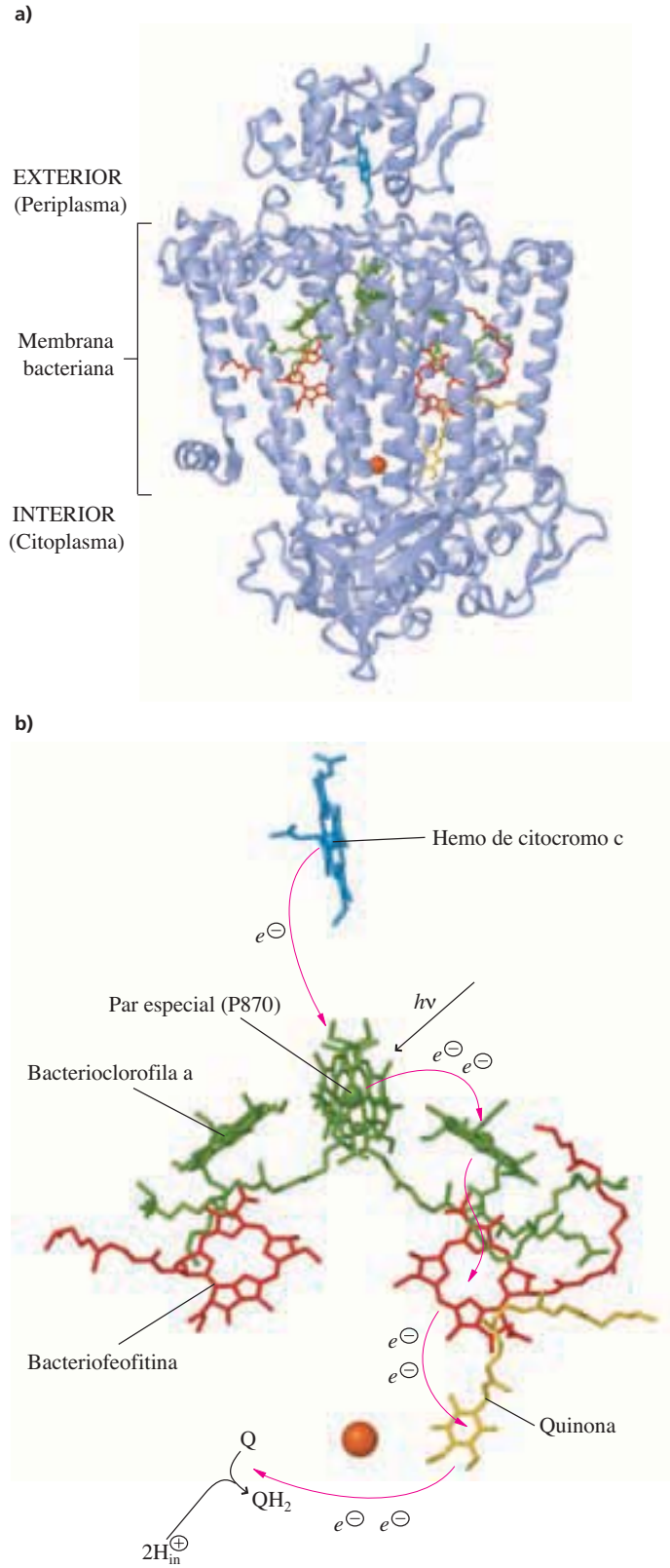
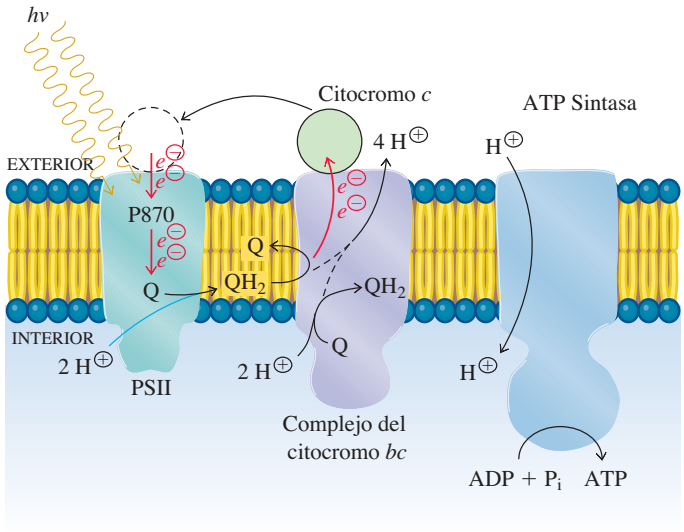


Figura 15.3 ▲
Transferencia de energía luminosa desde pigmentos antena de la clorofila al par especial de moléculas de clorofila. Los pigmentos antena (en gris) pueden capturar la luz, y la energía de excitación se transfiere entre las clorofilas antena hasta que llega al par especial de moléculas de clorofila en la ruta de transferencia de electrones (en verde). La ruta de transferencia de energía de excitación se marca en rojo. El par especial cede un electrón a la ruta de transferencia de electrones. Las moléculas de clorofila se mantienen en posiciones fijas, porque están estrechamente unidas a proteínas de membrana (que no se muestran).

Figura 15.5 ▶
Fotosistema II en la bacteria púrpura *Rhodobacter spaeroides.* **a)** El interior de la estructura consiste en dos subunidades homólogas del polipéptido que abarcan la membrana. Cada subunidad tiene cinco α hélices que atraviesan la membrana. Las moléculas de transferencia de electrones en el centro de reacción están emparedadas entre los polipéptidos del interior. El citocromo *c* se une al PSII en el lado periplásmico de la membrana (arriba). Una subunidad adicional cubre las subunidades interiores en la superficie citoplásmica (abajo). [PDB 1L9B] **b)** El centro de reacción tipo II contiene la cadena de transferencia de electrones. El par especial (P870) está cerca de la superficie periplásmica, cerca del grupo hemo del citocromo *c*. Cuando se absorbe la luz, los electrones son transferidos, uno por uno, del P870 a la BClf *a*, a la BPh y a una quinona enlazada, y de allí a una quinona ubicada en un sitio débilmente enlazado, junto al átomo central del hierro (anaranjado). Los electrones se regresan al P870 desde el citocromo *c*.





◀Figura 15.6
Fotosíntesis en las bacterias púrpura. Los pigmentos del complejo PSII absorben luz y dan lugar a la transferencia de electrones del P870 para formar QH_2 por vía de la cadena de transferencia de electrones en el centro de reacción. QH_2 se difunde hacia el complejo del citocromo *bc* donde los electrones son transferidos al citocromo *c*. Esta reacción se acopla a la transferencia de protones a través de la membrana. El gradiente de protones impulsa la síntesis de ATP. El citocromo *c* reducido se difunde dentro del espacio periplásmico hacia el PSII, donde reduce al $P870^{\oplus}$. Las reacciones del ciclo Q se ven con más detalle en la figura 14.11.

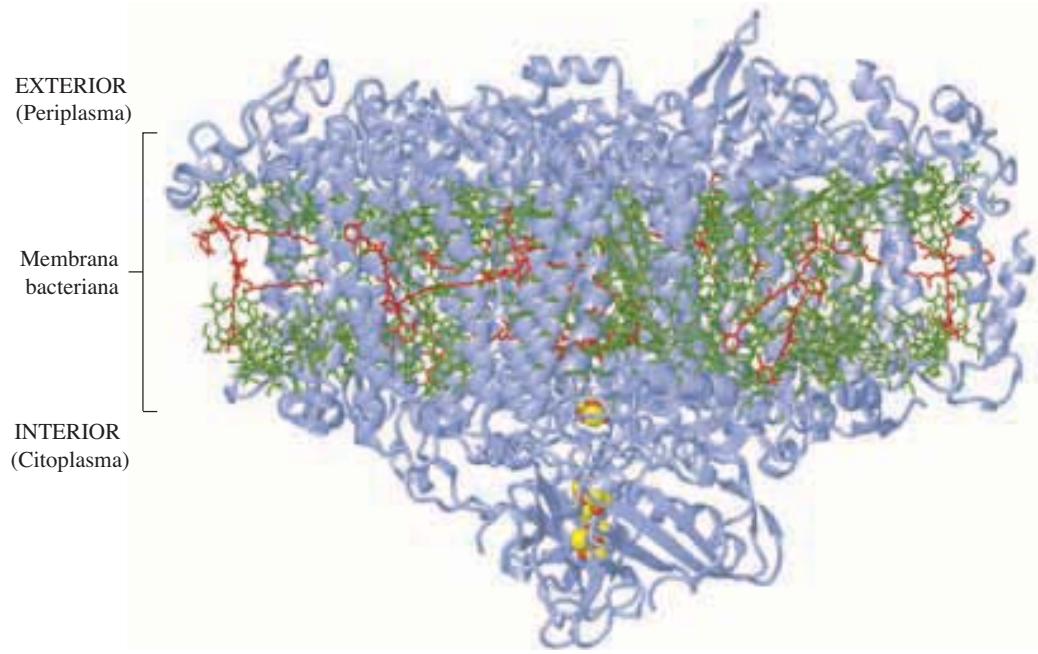
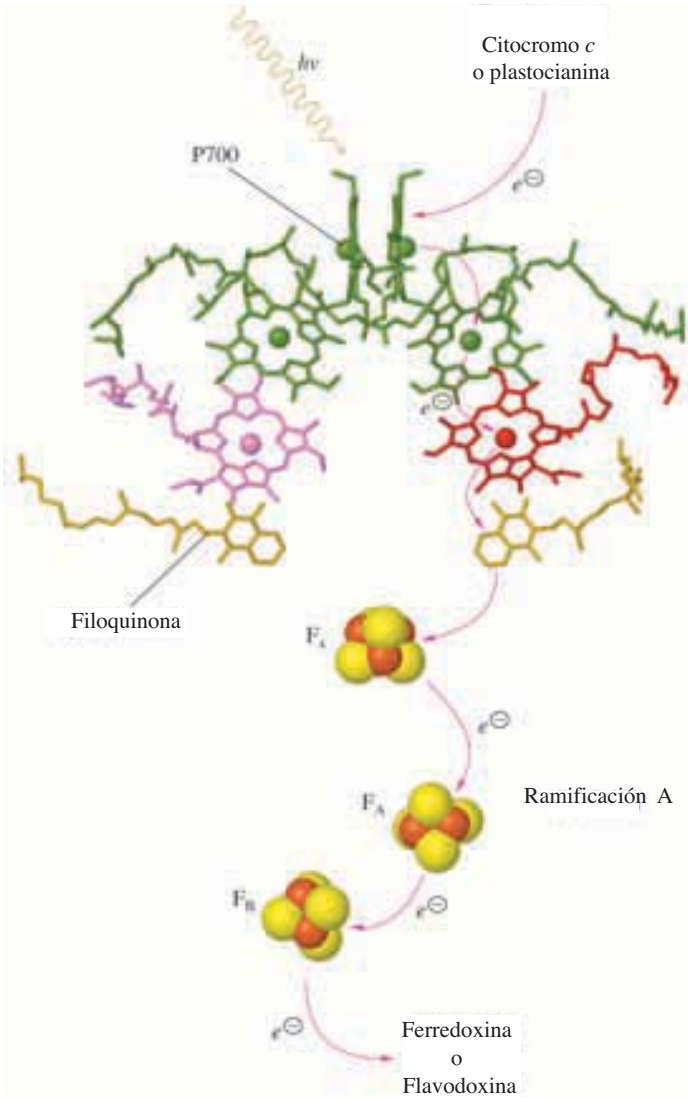
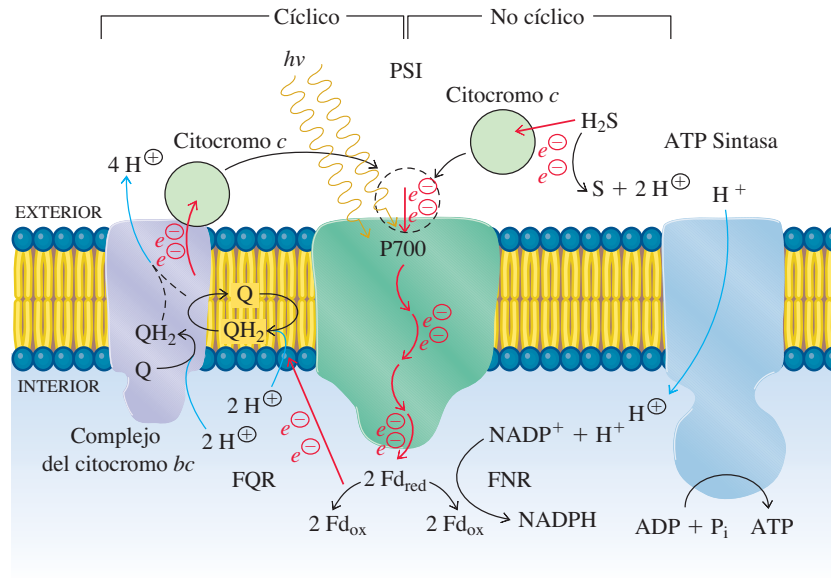


Figura 15.7 ▲
Estructura del fotosistema I (PSI) de la cianobacteria *Thermosynechococcus elongatus (Thermosynechococcus elongatus)*. El complejo contiene 96 clorofilas (en verde), 22 carotenoides (en rojo) y tres grupos hierro-azufre (en anaranjado). Hay 14 subunidades del polipéptido, y en su mayoría tienen α hélices que abarcan la membrana. [PDB 1JBO].



◀ Figura 15.8
Cadena de transferencia de electrones del PSI (centro de reacción tipo I). La transferencia de electrones comienza con el par especial de las moléculas de clorofila (P700) y sigue por una de las ramificaciones hasta la filoquinona. De allí, los electrones se transfieren a los grupos de Fe-S y al final a la ferredoxina. El citocromo *c* o la plastocianina reducen al $P700^{\oplus}$. [PDB1JB0].

Figura 15.9 ▶
Fotosíntesis en bacterias sulfurosas verdes. La fotoactivación del P700 causa la producción de la ferredoxina reducida en el lado citoplásmico de la membrana. La ferredoxina se convierte en el donador de electrones en una reacción catalizada por la ferredoxina: $NADP^{\oplus}$ reductasa (FNR), y da como resultado la producción del NADPH en el citoplasma. También la ferredoxina puede reducir Q a QH_2 en una reacción catalizada por la ferredoxina:quinona reductasa (FQR). El complejo del citocromo *bc* oxida a la QH_2 y causa la transferencia de electrones al citocromo *c* reducido y la transferencia de protones a través de la membrana. El citocromo *c* reduce en el caso normal al $P700^{\oplus}$ en el lado periplásmico de la membrana. En el proceso no cíclico, el citocromo *c* reducido se fabrica en reacciones que están acopladas a la oxidación de los compuestos sulfurados, como H_2S. La transferencia de electrones se indica con flechas rojas.



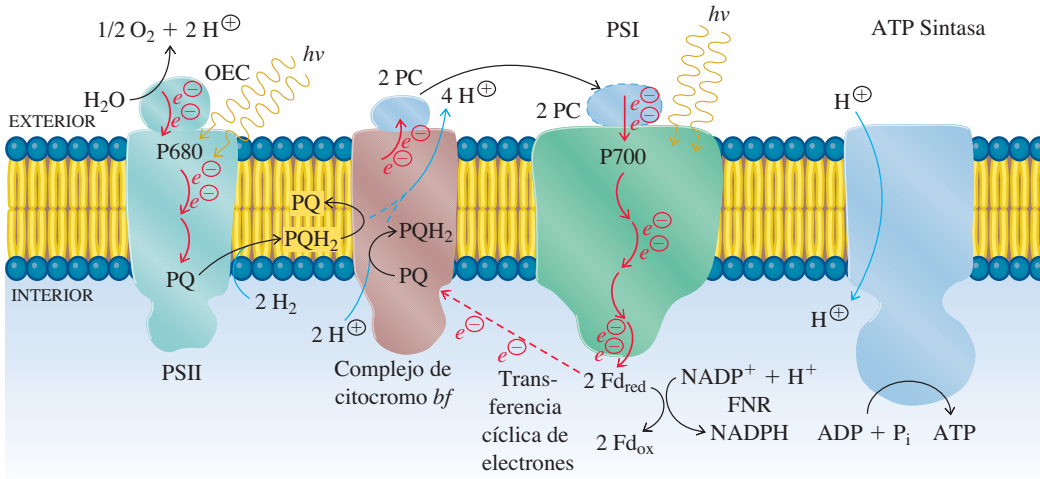
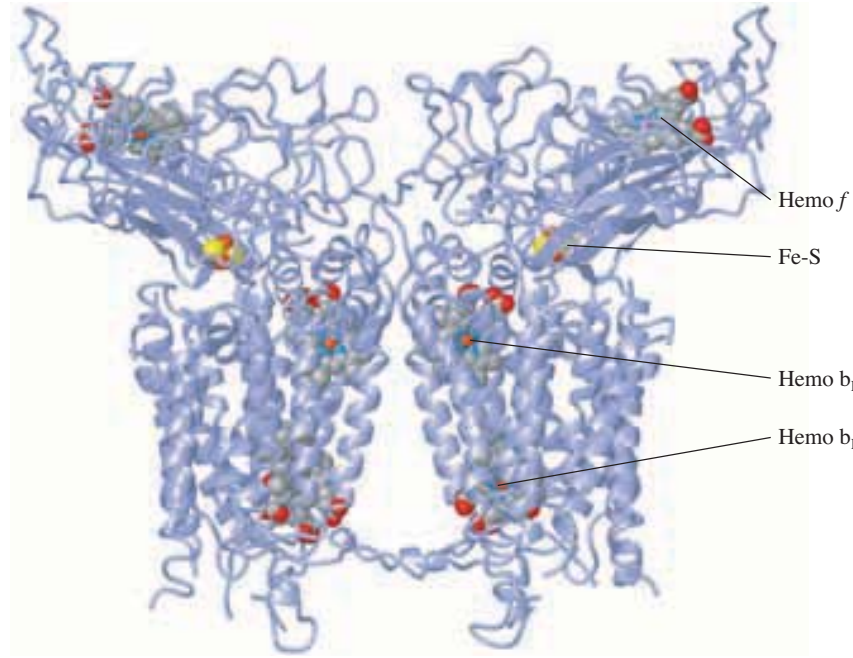
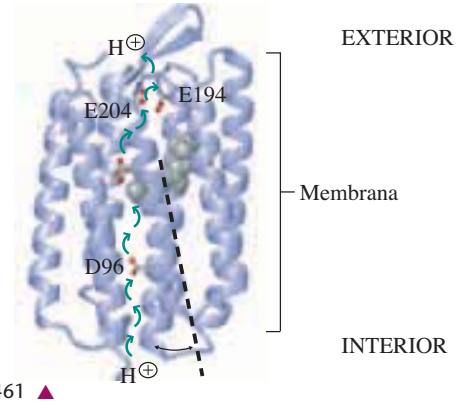


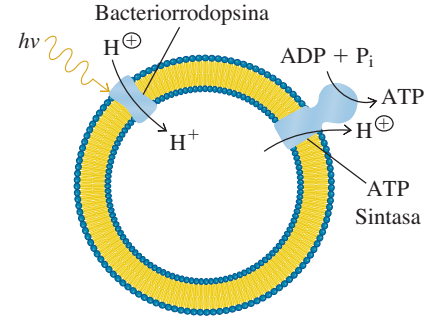
Figura 15.10 ▲
Fotosíntesis en cianobacterias. La luz (flechas onduladas) es capturada y usada para impulsar el transporte de electrones (obtenidos del agua) desde el PSII hasta el PSI y la ferredoxina, pasando por el complejo del citocromo *bf*. Este proceso puede generar el NADPH y un gradiente de concentración de protones que se usa para impulsar la fosforilación del ADP. Por cada molécula de agua oxidada a $\frac{1}{2}O_2$ por el complejo de evolución de oxígeno (OAC), se reduce una molécula de $NADP^{\oplus}$ a una de NADPH. Para simplificar, se muestran el PSI, el PSII y el citocromo *bf* cercanos entre sí en la membrana plasmática, pero en la mayor parte de las especies están dentro de las estructuras de la membrana interna. La plastoquinona (PQ) es el portador móvil entre el PSII y el complejo del citocromo *bf*. En este ejemplo, la plastocianina (PC) es el portador móvil entre el complejo del citocromo *bf* y el PSI.

Figura 15.11 ▶
Complejo del citocromo *bf* en la cianobacteria *Mastigocladus laminosus*. El complejo contiene dos enzimas funcionales, como en el complejo III (compárese con la figura 14.10). Los componentes de la transferencia primaria de electrones son el hemo b_L y el hemo b_H (los sitios de reacciones de oxidación en el ciclo Q), el grupo hierro-azufre (Fe-S) en el ISP, y el hemo *f*. Cada unidad contiene también un clorofila ∂, un β-caroteno, y un hemo *x* poco común, cuya función todavía se desconoce (no se muestra).





Página 461 ▲
Bacteriorrodopsina



Página 461 ▲
La bacteriorrodopsina crea un gradiente de protones que impulsa la síntesis de ATP. Se crearon vesículas artificiales de lípido con contenido de bacteriorrodopsina y ATP sintasa con la orientación que se muestra. Cuando se iluminaron estas vesículas, la bacteriorrodopsina bombeó protones al interior de la vesícula, y el gradiente de protones resultante activó la ATP sintasa.

Figura 15.17 ▶
Distribución de componentes fotosintéticos que abarcan la membrana, entre el estroma y los tilacoides de grana. El PSI se encuentra principalmente en los tilacoides de estroma. El PSII se encuentra en particular en los tilacoides de grana. El complejo del citocromo *bf* se encuentra en las membranas tilacoidales, tanto de estroma como de grana.
La ATP sintasa está exclusivamente en los tilacoides de estroma.

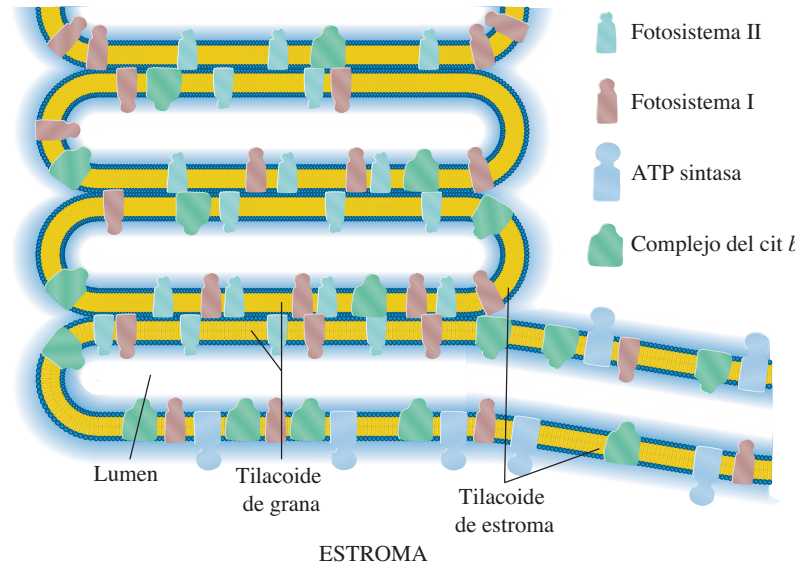
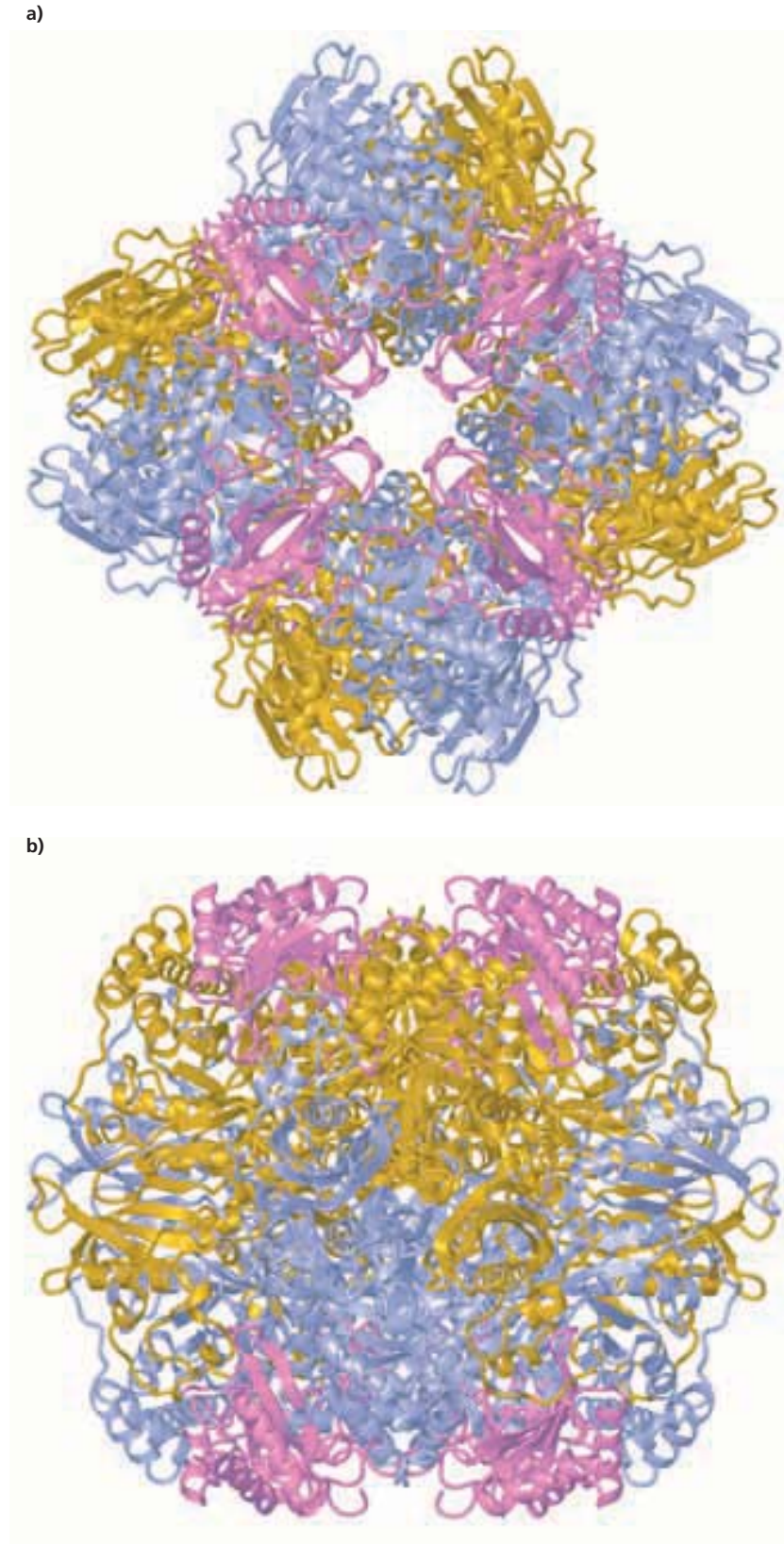
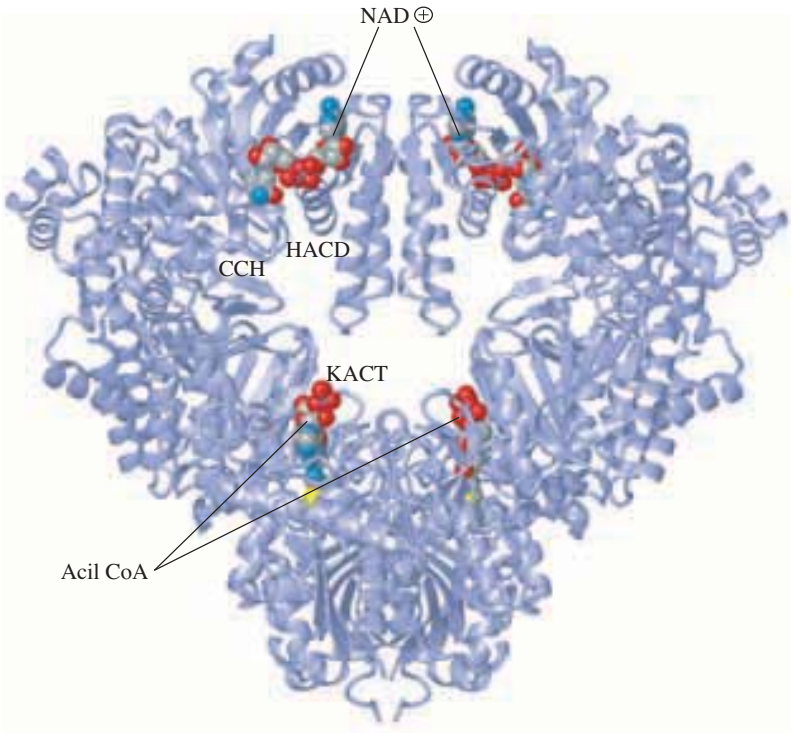


Figura 15.21 ▶
Vistas superior y lateral de la estructura cuaternaria (L_8S_8) de la ribulosa 1,5-*bi*fosfato carboxilasa-oxigenasa (Rubisco) de la espinaca (*Spinacia oleracea*). Las subunidades grandes se muestran alternativamente en amarillo y azul; las subunidades pequeñas están en púrpura. [PDB 1RCX].

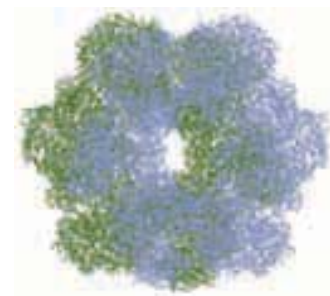




◀ Página 502

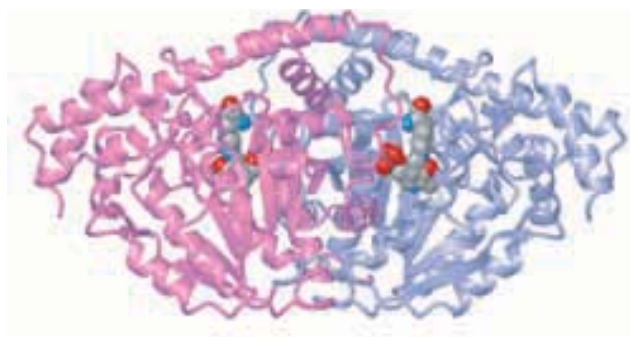
Estructura del complejo multienzimático para oxidación del ácido graso en β, en la bacteria *Pseudomonas fragi*. En esta estructura, una molécula de acil-CoA está unida a cada uno de los sitios KACT. [PDB 1WDK].

Figura 16.31 ▲
Albúmina de suero humano. Se muestran siete moléculas enlazadas de palmitato. [PDB 1E7H].

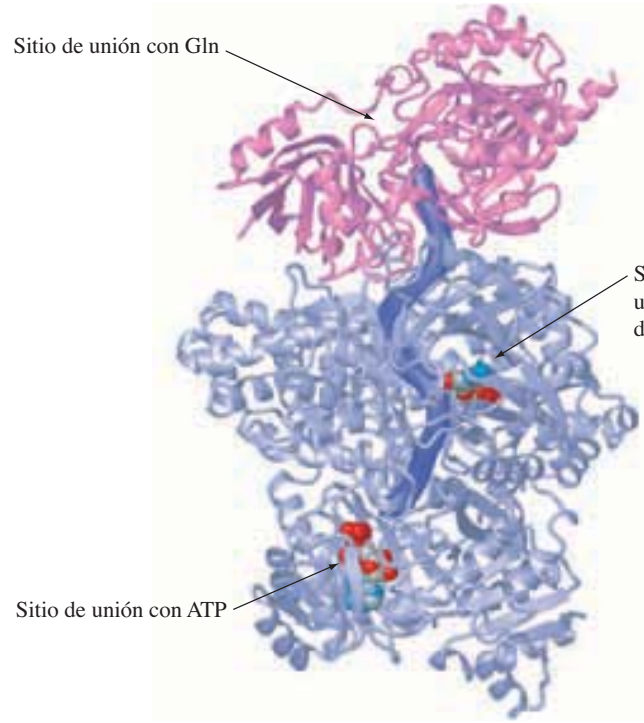


▲ Página 520

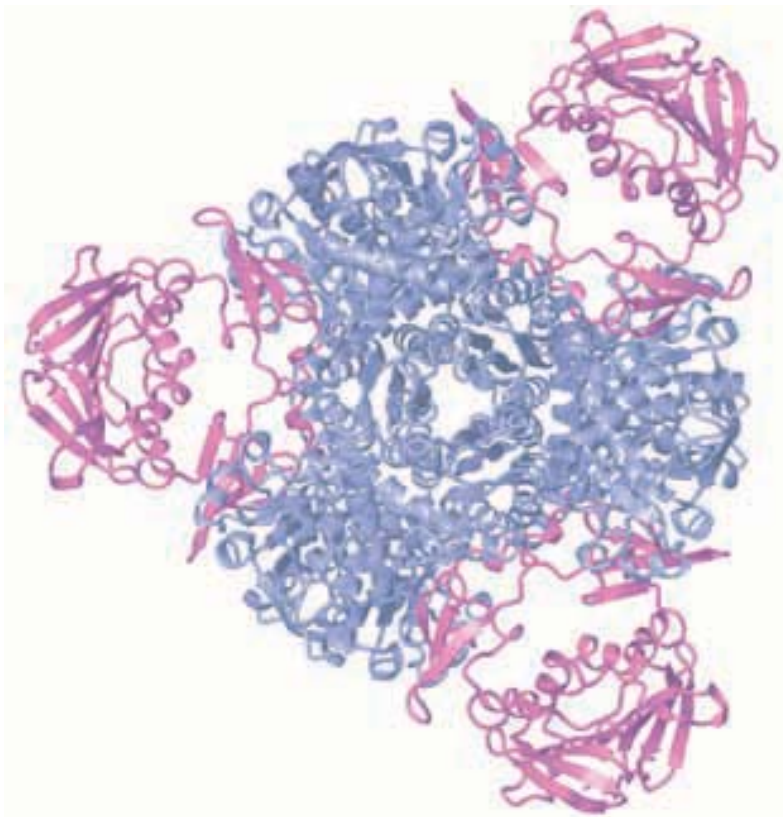
Arriba: Glutamina sintetasa de la bacteria *Salmonella typhimurium*. Doce subunidades idénticas se ordenan con simetría hexagonal. [PDB 2GLS].



◀ Figura 17.7
Aspartato transaminasa citosólica del cerdo (*Sus scrofa*); es dímera con subunidades idénticas (los monómeros individuales están en púrpura y azul). Se muestra una molécula de la coenzima fosfato de piridoxal (modelo volumétrico) en cada sitio activo. [PDB 1AJR].



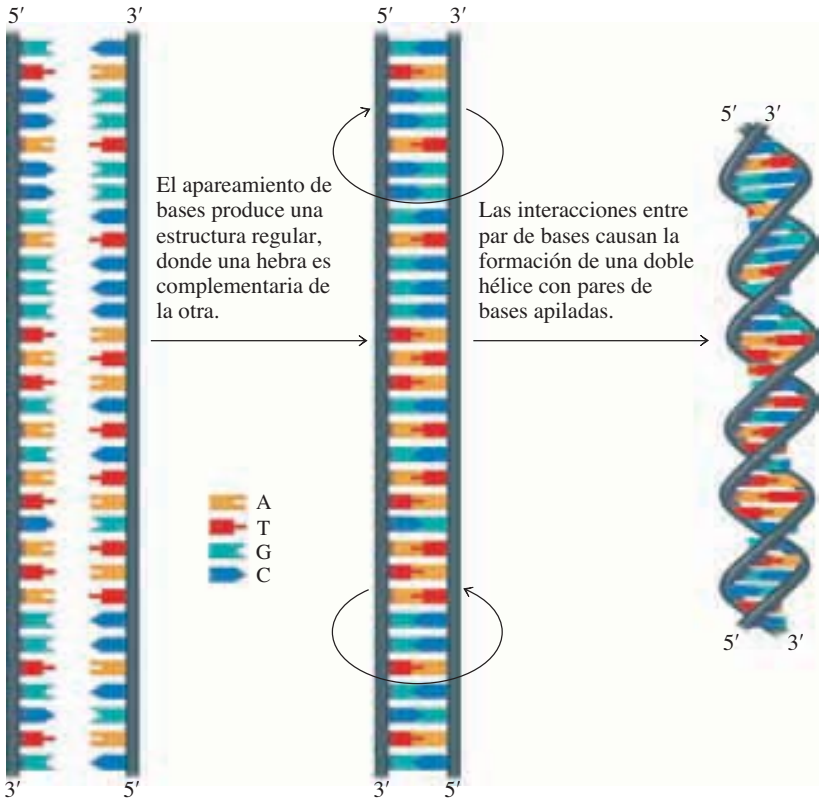
Página 565 ▶
Estructura de cinta de la carbamoílo fosfato sintetasa de *E. coli*. La subunidad pequeña (dominio *N*-terminal, púrpura) contiene el sitio activo para la hidrólisis de la glutamina, que libera NH_3. La unidad grande se muestra en azul. En su sitio de unión superior de ATP, el NH_3 se convierte en el intermediario inestable carbamato (H_2N—COOH), que se fosforila en el sitio de enlace con ATP C-terminal (inferior). A cada sitio de unión con ATP está unida una molécula de ADP. El túnel molecular que conecta a los tres sitios activos se indica con la barra azul. [PDP 1A9X].



◀**Figura 18.11**
Estructura compleja de la ATCasa de *Escherichia coli*. Las subunidades reguladoras (púrpura) están unidas a un trímero central de las subunidades catalíticas (en azul). Dos de esos hexámeros se apilan uno con otro para crear la enzima completa con 12 subunidades. [PDB 9ATC].

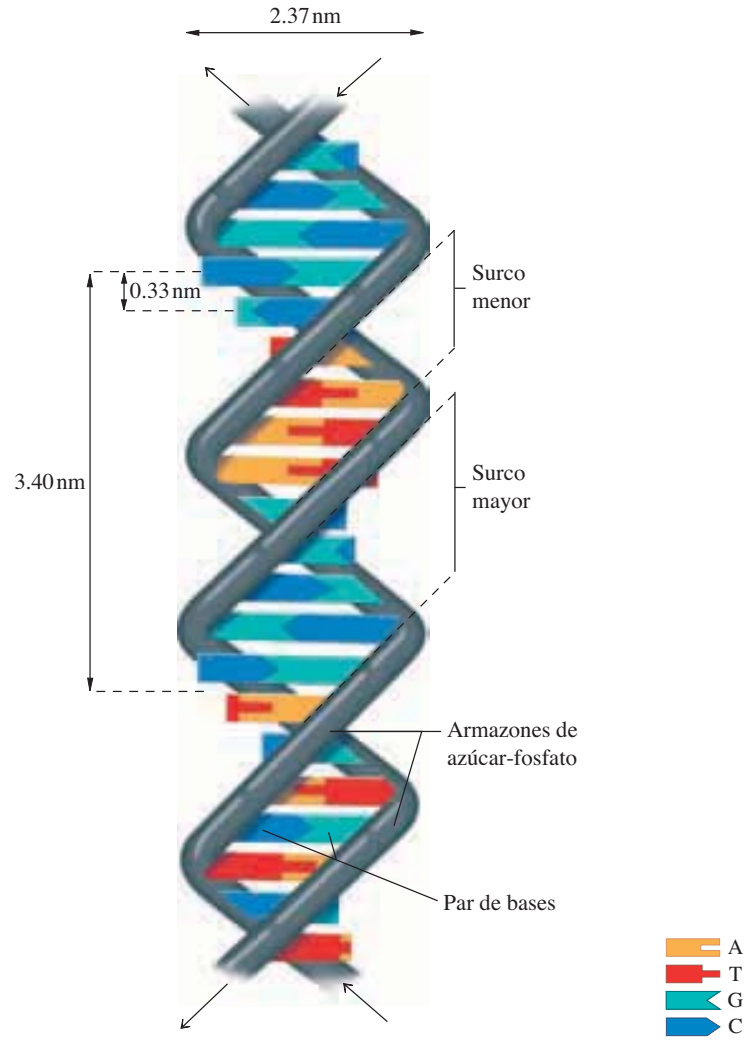
◀ Página 572
Estructura de cinta de la dihidrofolato reductasa humana, con el análogo del sustrato metotrexato (en rojo) y el cosustrato NADPH (en amarillo) unidos en el sitio activo. [PDB 1DLS].

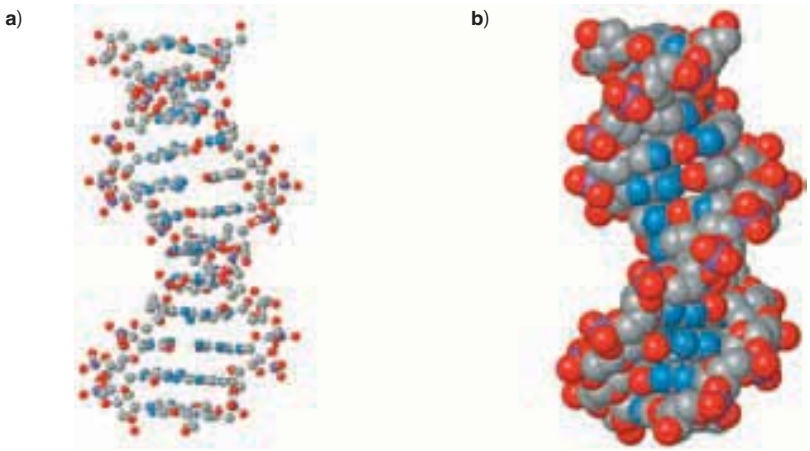
Figura 19.10 ▲
Desoxiguanosina-5′-monofosfato (dGMP). Se han omitido los átomos de hidrógeno para mayor claridad. Clave de colores: carbono = gris, nitrógeno = azul, oxígeno = rojo, fósforo = púrpura.



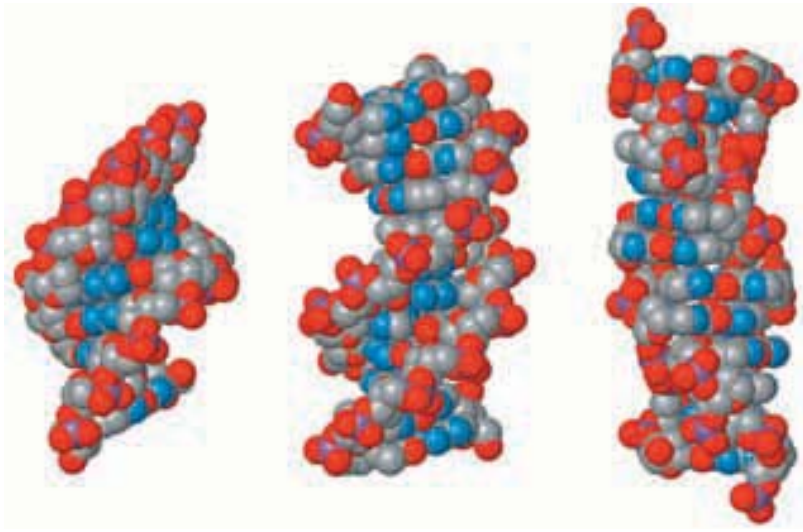
◀**Figura 19.13**
Apareamiento e interacción de bases complementarias en ADN de doble hebra.

Figura 19.14 ▶
Estructura tridimensional de B-ADN. Este modelo muestra la orientación de los pares de bases y la columna vertebral de azúcar-fosfato, así como los tamaños relativos de las bases de pirimidina y purina. La columna vertebral de azúcar-fosfato se enrolla en torno al exterior de la hélice y las bases ocupan el interior. El apilamiento de los pares de bases forma dos hendiduras de ancho desigual, los surcos mayor y menor. El diámetro de la hélice es 2.37 nm y la distancia entre pares de bases es 0.33 nm. La distancia para completar una vuelta es 3.40 nm. (Para mayor claridad, se ha dejado algo de espacio entre los pares de bases apilados, y las interacciones entre las bases complementarias se muestran en forma esquemática).





◀**Figura 19.15**
B-ADN. **a)** Modelo de bolas y palillos. Los pares de bases son casi perpendiculares a las columnas vertebrales de azúcar-fosfato. **b)** Modelo de relleno espacial. Clave de colores: carbono = gris, nitrógeno = azul, oxígeno = rojo, fósforo = púrpura. (Nucleic Acids Database BD0001].



◀Figura 19.18
La conformación A-ADN (izquierda) se favorece cuando el ADN se deshidrata [NDB AD0001]. El B-ADN (centro) es la conformación que se encuentra en forma normal dentro de las células [NDB BD0001]. La conformación Z-ADN (derecha) se favorece en ciertas secuencias ricas en G/C [NDB ZDJ050].

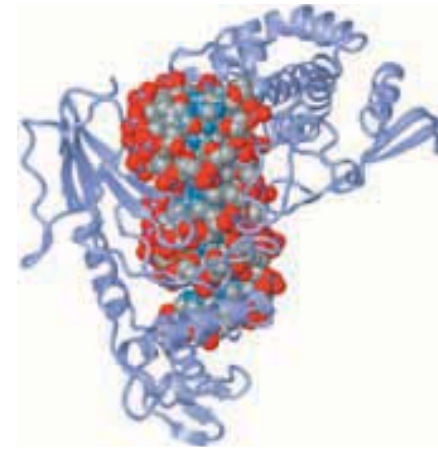


Figura 19.20 ▶
Topoisomerasa I humana (Homo sapiens) unida a ADN. [PDB 1A31].

Figura 19.21 ▶
Estructuras de lazo en la horquilla en el ARN. Los polinucleótidos de una hebra, como ARN, pueden formar lazos en horquillas, u horquillas, cuando regiones cortas de secuencias complementarias forman pares de bases. El tallo de la estructura consiste en nucleótidos con bases apareadas, y el lazo consiste en nucleótidos no complementarios. Nótese que las cadenas en el tallo son antiparalelas.

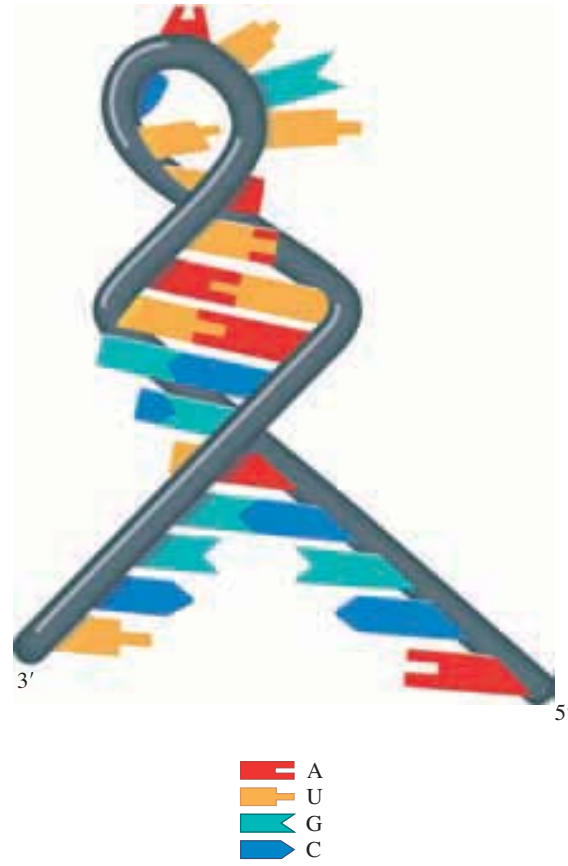


Figura 19.23 ▶
Diagrama de la estructura del nucleosoma. **a)** Octámero de las histonas. **b)** Nucleosomas. Cada nucleosoma está formado por una partícula central más histona H1 y ADN de enlace. La partícula central del nucleosoma está formada por un octámero de histona y aproximadamente 146 pares de bases. La histona H1 une a la partícula central y al ADN de enlace.

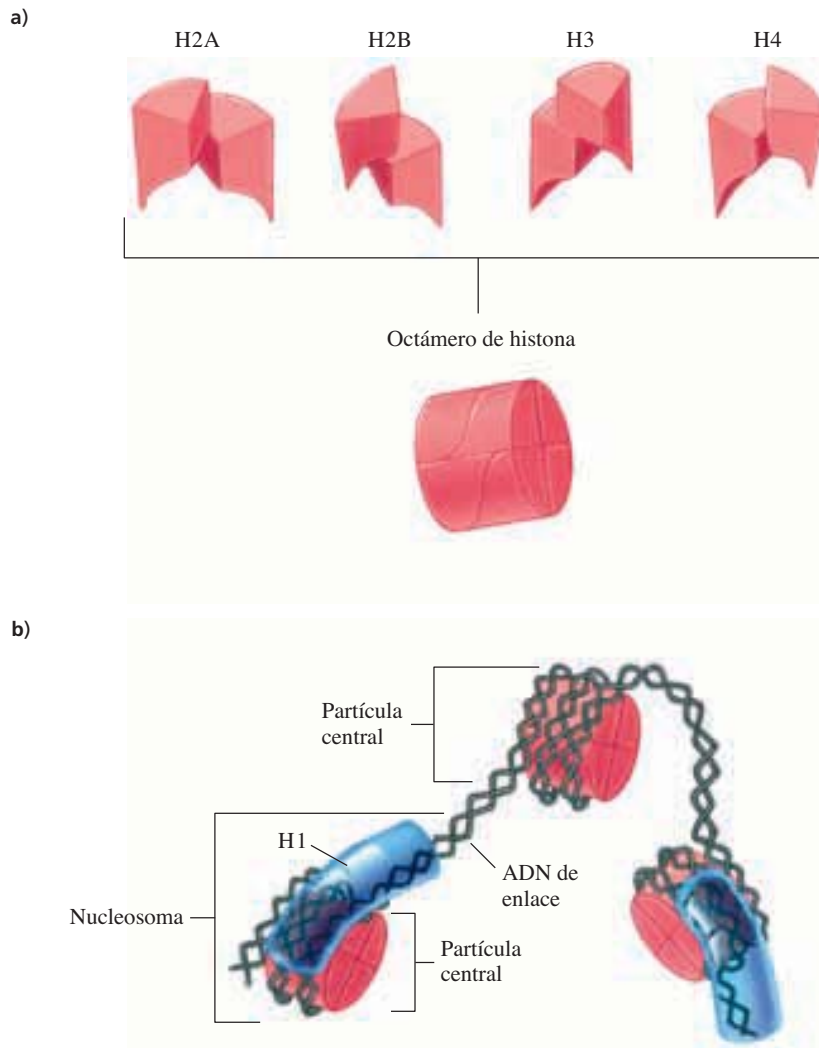
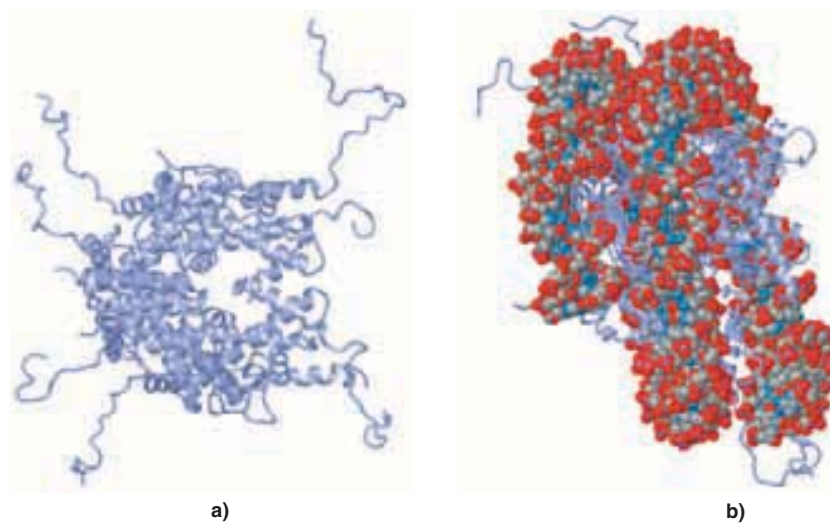
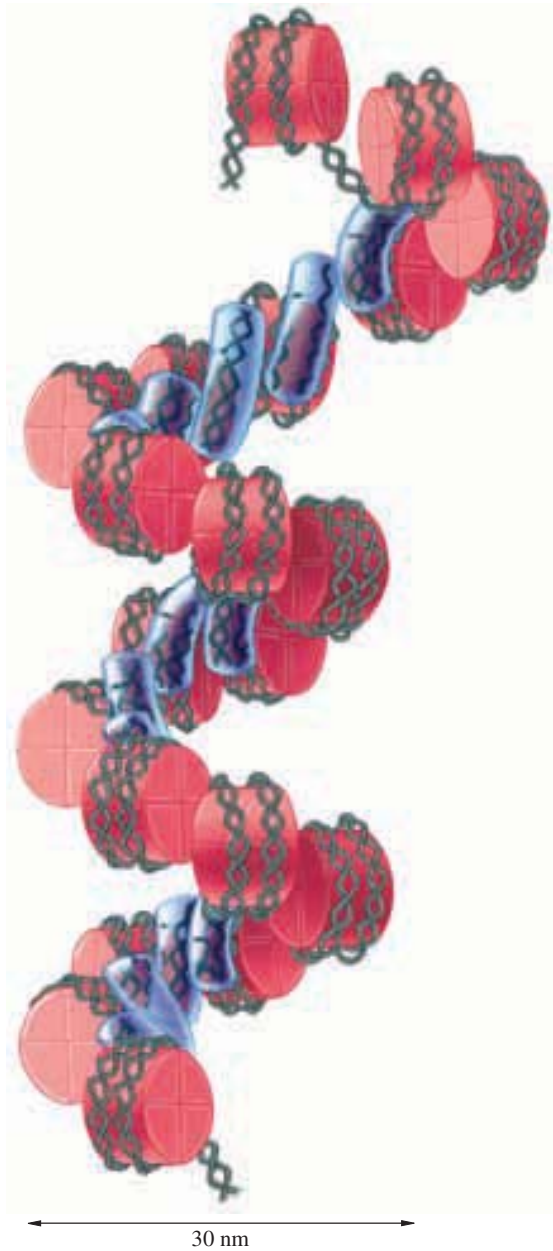


Figura 19.24 ▶
Estructura de la partícula central del nucleosoma del pollo (*Gallus gallus*). **a)** Octámero de histona. **b)** Octámero de histona unido a ADN: vista lateral que muestra la forma discoidal de la partícula. [PDB 1EQZ].





◀Figura 19.25
Modelo de la fibra de cromatina de 30 nm. En este modelo se ve la fibra como solenoide o hélice, formada por nucleosomas individuales. Los nucleosomas se asocian por contactos entre moléculas adyacentes de histona H1.

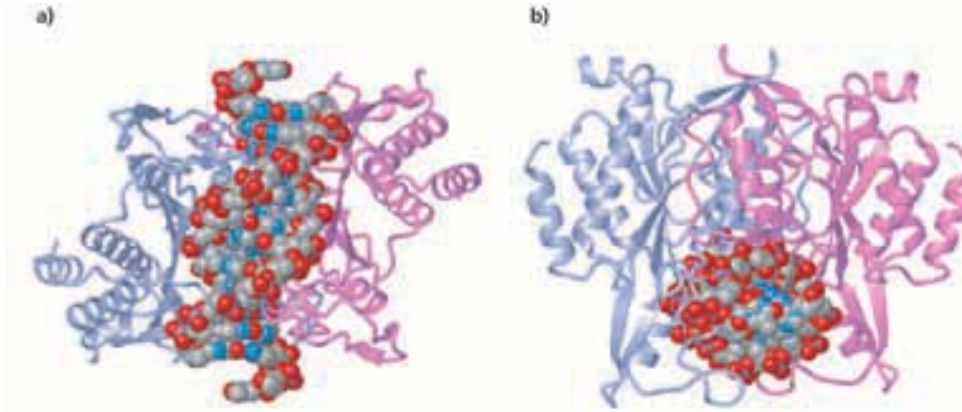
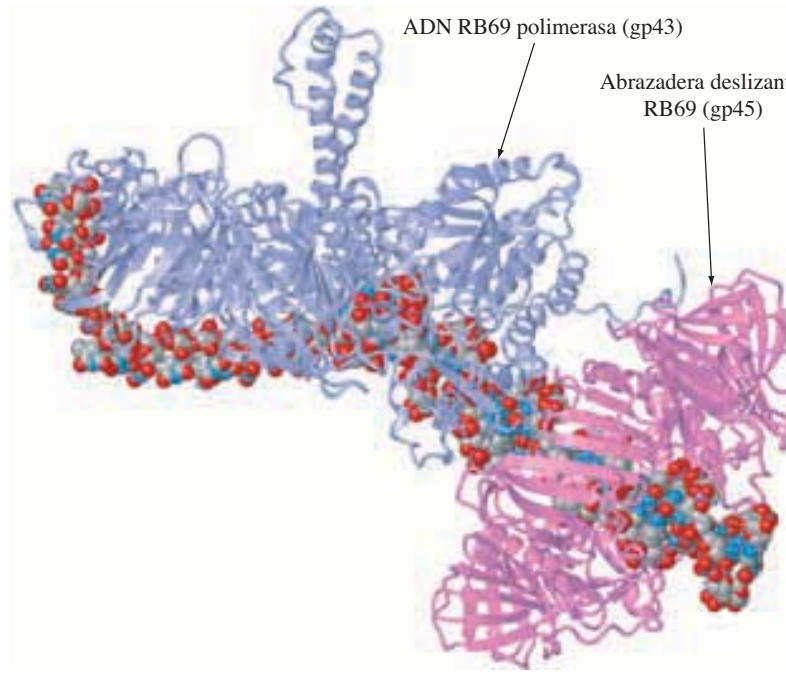


Figura 19.31 ▲
*Eco*RI unida a ADN. La *Eco*RI está formada por dos subunidades idénticas (púrpura y azul). La enzima está unida a un fragmento de ADN con la secuencia CGCGAATTCGCG (subrayar la secuencia de reconocimiento). **a)** Vista lateral. **b)** Vista superior.

Figura 20.8 ▶
Modelo de ADN polimerasa de bacteriófago unida a ADN. La abrazadera deslizante (púrpura) rodea al ADN de doble hebra recién sintetizado. La subunidad que contiene el sitio activo se muestra en azul. El extremo 3′ de la hebra naciente se coloca en el sitio activo, y la región de una hebra, de la hebra de plantilla, se extiende hacia la izquierda. La ADN polimerasa se mueve de derecha a izquierda a medida que se extiende la hebra naciente. [PDB 1WAI].



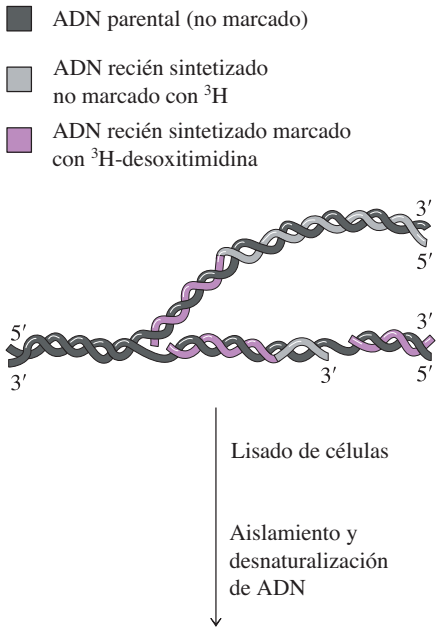


Figura 20.10 ▲
Síntesis discontinua de ADN demostrada por análisis de ADN recién sintetizado. Las moléculas nacientes de ADN se marcan en *E. coli* con un pulso corto de ^{3}H-desoxitimidina. Las células se lisan, se aísla el ADN y se separan las hebras por tamaños. Las moléculas marcadas de ADN caen en dos clases: moléculas largas, provenientes de la síntesis continua de la hebra líder, y fragmentos cortos debidos a síntesis discontinua de la hebra retrasada.

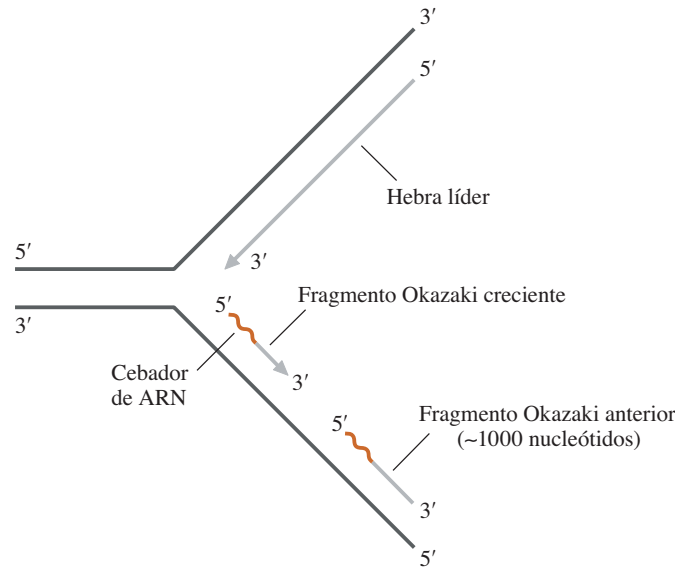


Figura 20.11 ▶
Diagrama de la síntesis de hebra retrasada. Un tramo corto de ARN (café) sirve como cebador para la síntesis de cada fragmento Okazaki. La longitud del fragmento Okazaki se determina por la distancia entre los cebadores sucesivos de ARN.

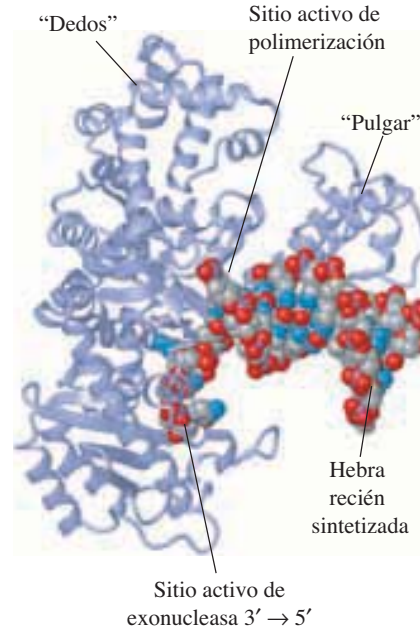
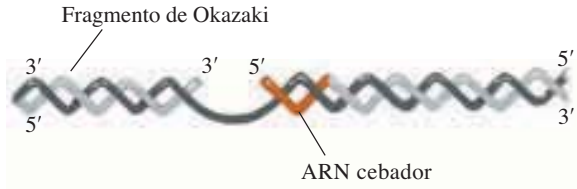


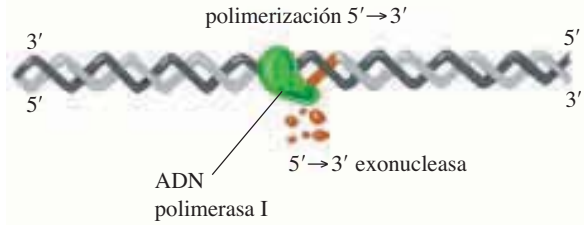
Figura 20.12 ▲
Estructura del fragmento Klenow con un fragmento de ADN unido. La enzima rodea al ADN. El extremo 3′ de la hebra naciente se acomoda en el sitio de la exonucleasa 3′ → 5′ (izquierda abajo). Durante la síntesis *in vivo* del ADN, la hebra plantilla se extiende saliendo de la región de doble hebra que se muestra en la estructura cristalina. [PDB 1KLN].

◀Figura 20.13
Unión de fragmentos Okazaki por la acción combinada de ADN polimerasa I y ADN ligasa.

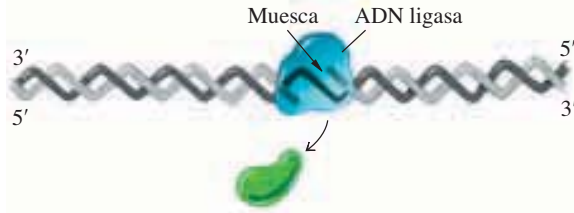
a) Unión de fragmentos Okazaki por la acción combinada de ADN polimerasa I y ADN ligasa.



b) La ADN polimerasa I prolonga el fragmento de Okazaki, en tanto que su actividad de exonucleasa 5′→3′ elimina al ARN cebador. Este proceso se llama traslación de muesca y da como resultado el movimiento de la muesca a lo largo de la hebra retrasada.



c) La ADN polimerasa I se disocia después de prolongar 10 a 12 nucleótidos el fragmento de Okazaki. La ADN ligasa se une a la muesca.



d) La ADN ligasa cataliza la formación de un enlace fosfodiéster, que sella la muesca y crea una hebra retrasada continua. A continuación la hebra se disocia del ADN.

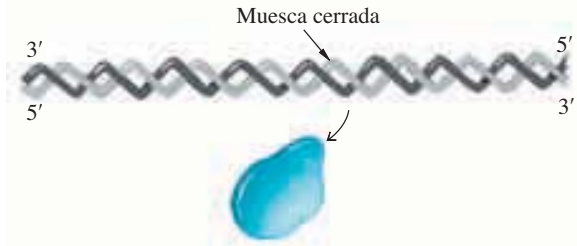
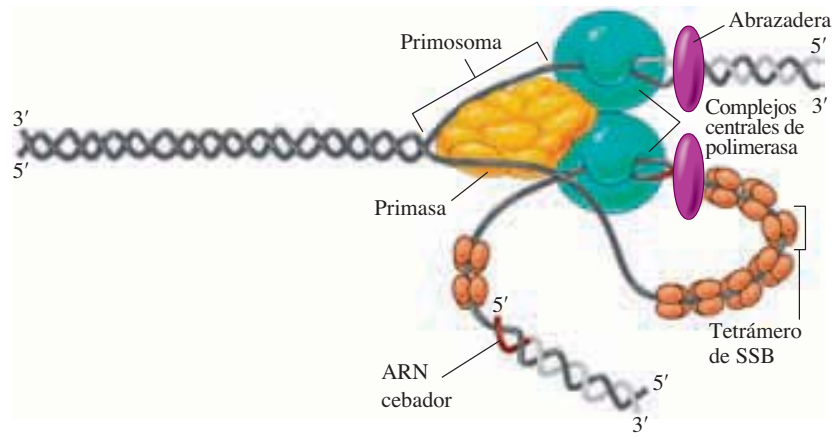
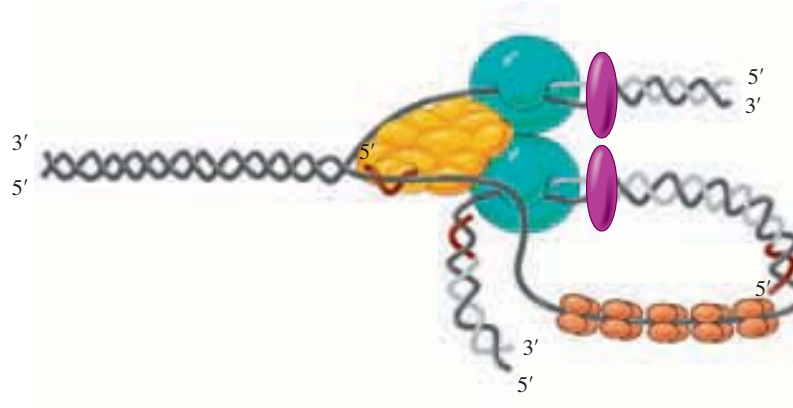


Figura 20.15 ▶
Síntesis simultánea de hebras líder y retrasada en una horquilla de replicación. El replisoma contiene la holoenzima ADN polimerasa III (sólo se muestran los complejos centrales), un primosoma que contiene primasa, una helicasa y otras subunidades, así como complementos adicionales, incluyendo la proteína de unión de una hebra (SSB). Un complejo central de la holoenzima sintetiza la hebra líder, en tanto que el otro complejo central sintetiza la hebra retrasada. La plantilla de la hebra retrasada se dobla hacia atrás a través del replisoma, para que se puedan sintetizar las hebras líder y retrasada en la misma dirección que el movimiento de la horquilla.

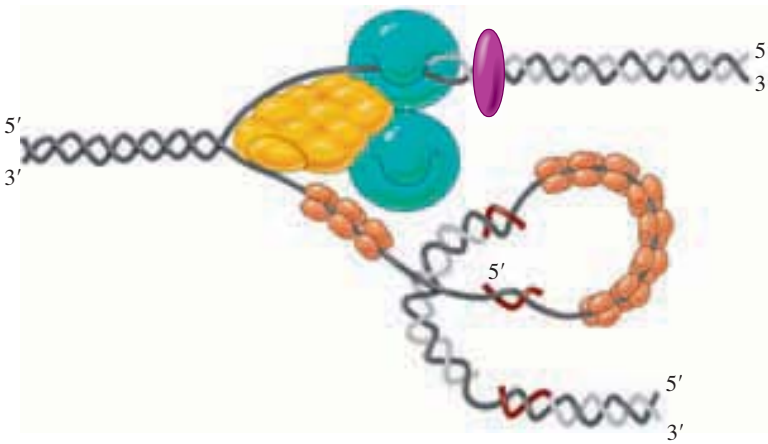
a) La plantilla de hebra retrasada se tuerce hacia atrás por el replisoma para que las hebras líder y retrasada se sinteticen en la misma dirección. La SSB se une al ADN de una hebra.



b) Como la helicasa destuerce la plantilla de ADN, la primasa sintetiza un cebador de ARN. La polimerasa de hebra retrasada completa un fragmento de Okazaki.



c) Cuando la polimerasa de hebra atrasada se encuentra con el fragmento Okazaki anterior, libera la hebra retrasada.



d) La polimerasa de hebra retrasada se une a un cebador recién sintetizado y comienza a sintetizar otro fragmento de Okazaki.

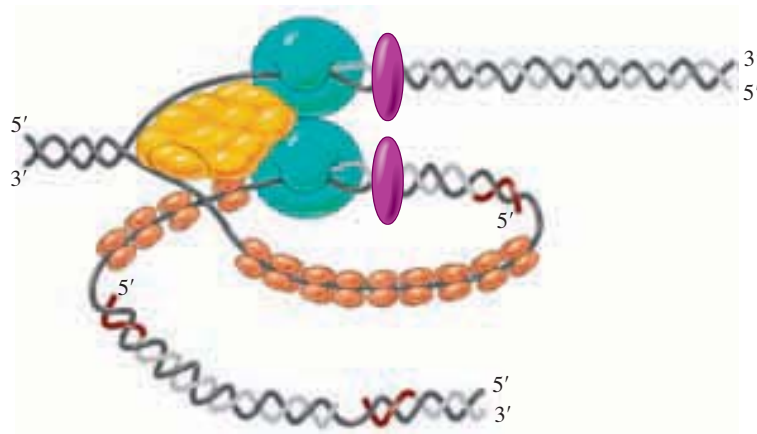
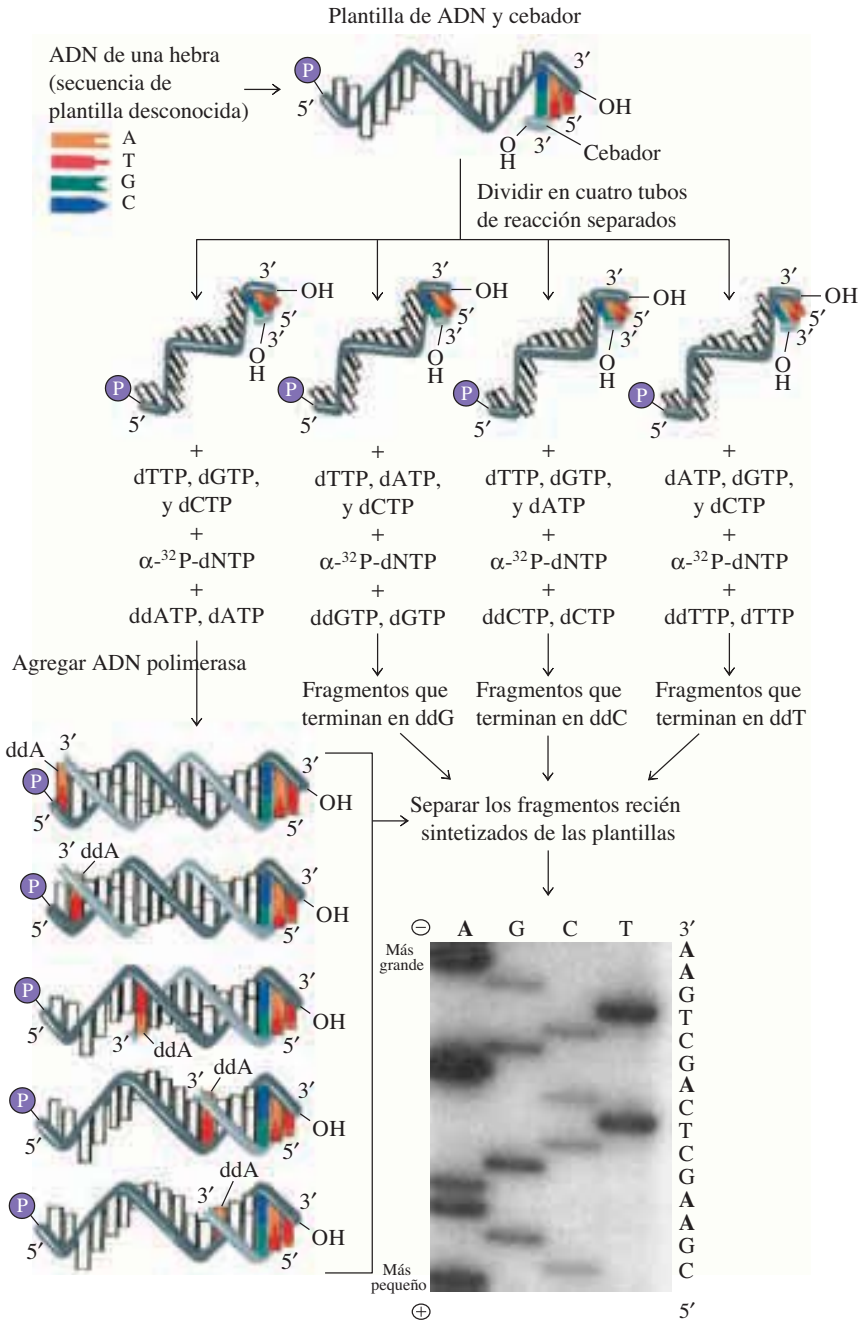


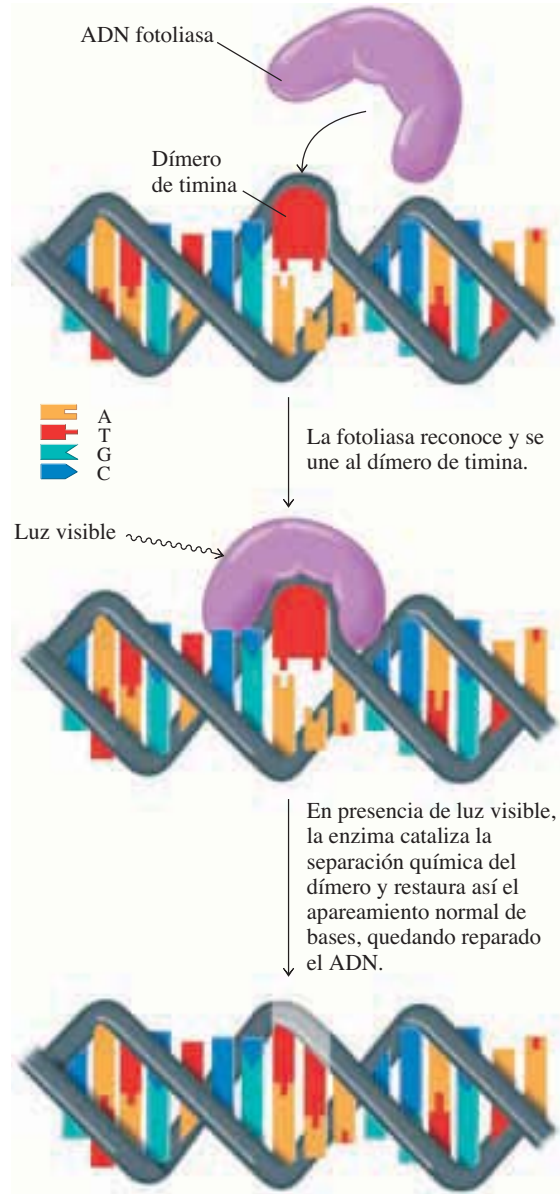
Figura 20.17 ▲
Estructura de Tus (sustancia de utilización del terminador) de *E. coli* unida a ADN. La Tus se une a secuencias específicas en el sitio de terminación de la replicación del ADN. La proteína enlazada bloquea el movimiento del replisoma. [PDB 1ECR].

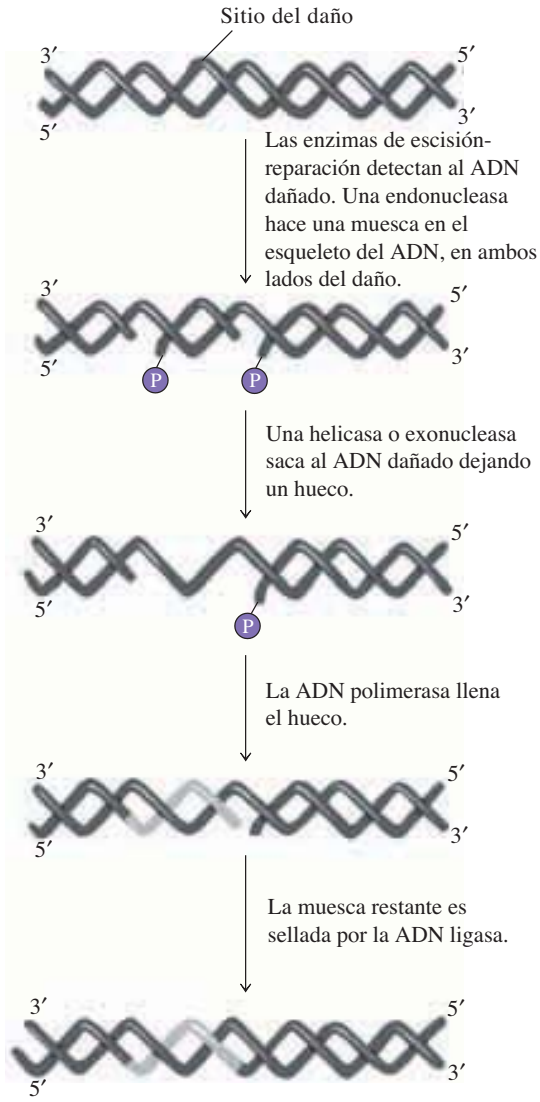


◀ Página 633

Método Sanger para secuenciar ADN. La adición de una pequeña cantidad de determinado didesoxinucleósido trifosfato (ddNTP) a cada mezcla de reacción hace que termine la síntesis de ADN cuando ese didesoxinucleótido se incorpora en lugar del nucleótido normal. Las posiciones de los didesoxinucleótidos incorporados, determinadas por las longitudes de los fragmentos de ADN, indican las posiciones del nucleótido correspondiente en la secuencia. Los fragmentos generados durante la síntesis con cada ddNTP se separan por tamaño usando un gel de secuenciación electroforética, y la secuencia del ADN se puede leer por una autorradiografía del gel (como se ve en la columna de letras a la derecha del gel).

Figura 20.20 ▶
Reparación de dímeros de timina por ADN fotoliasa.





◀Figura 20.21
Ruta general de escisión-reparación.

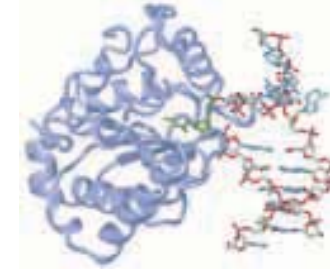


Figura 20.23 ▲
Uracilo *N*-glicosilasa, de mitocondrias humanas. La enzima se une a un nucleótido que contenga uracilo (en verde) que se haya desprendido de la región apilada en el ADN de doble hebra. [PDB 1EMH].

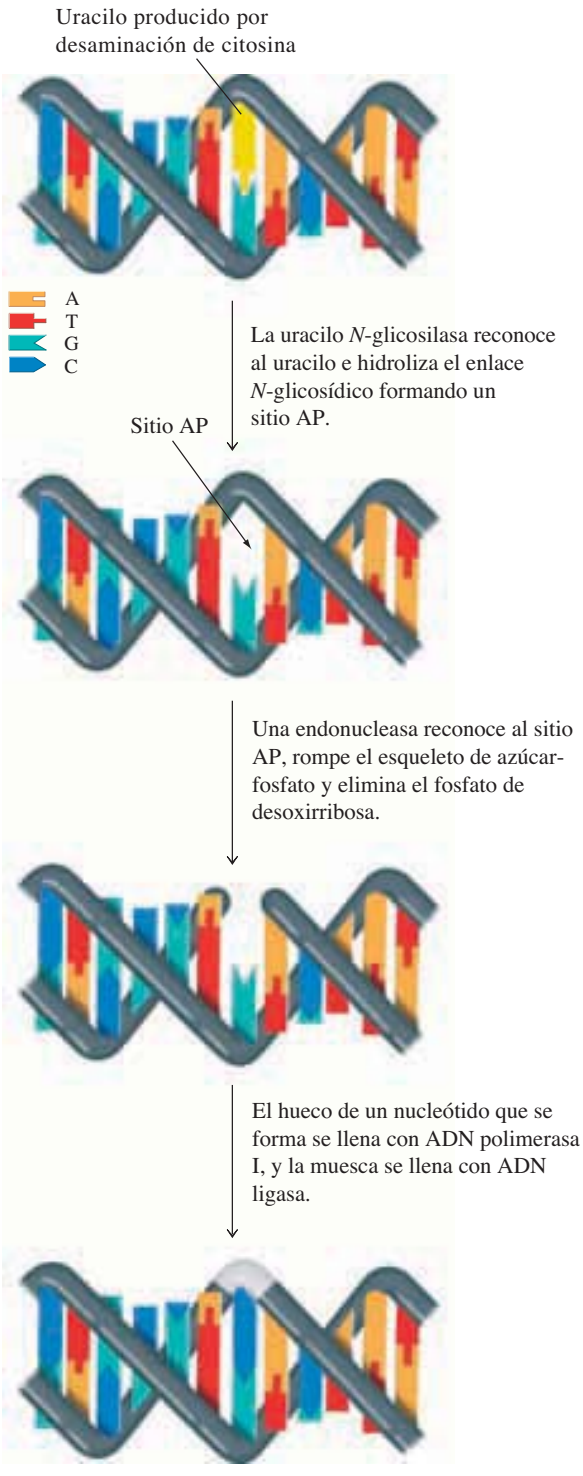


Figura 20.24 ▲
Reparación del daño causado por desaminación de citosina.

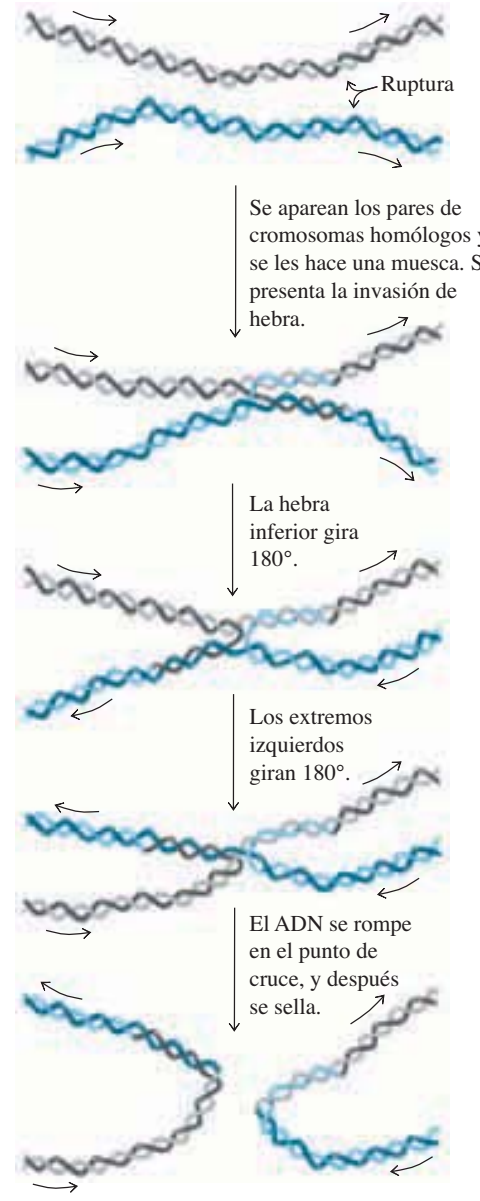


Figura 20.25 ▲
Modelo Holliday de la recombinación general. Primero se introducen muescas en una región homóloga de cada molécula. Por posterior invasión de hebra, ruptura de ADN en la unión de cruce, y sellado de las hebras con muesca se produce el intercambio de los extremos de los cromosomas.

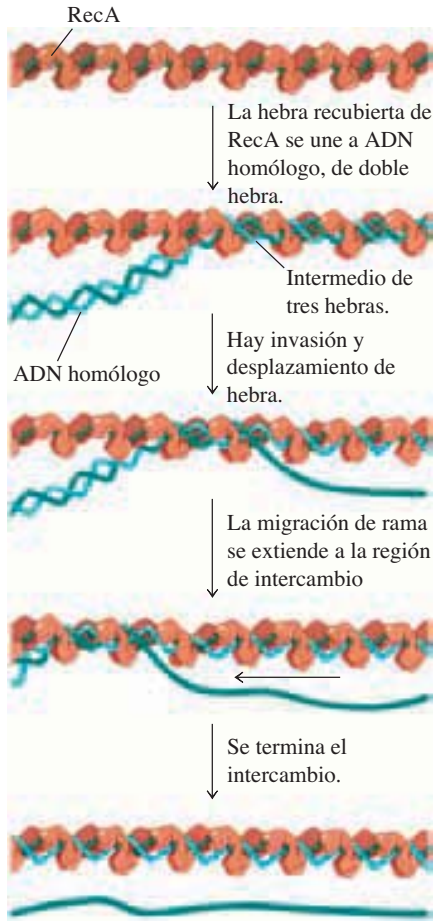


Figura 20.26 ▲
Intercambio de hebras catalizado por RecA.

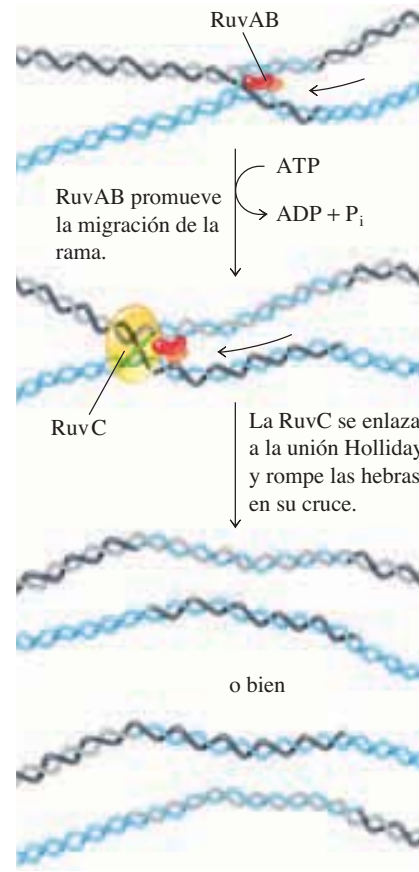


Figura 20.27 ▲
Acción de proteínas Ruv en uniones Holliday. La RuvAB promueve la migración de la rama en una reacción que requiere hidrólisis de ATP. La RuvC rompe las uniones Holliday. Se pueden generar dos tipos de moléculas recombinantes en esta reacción.

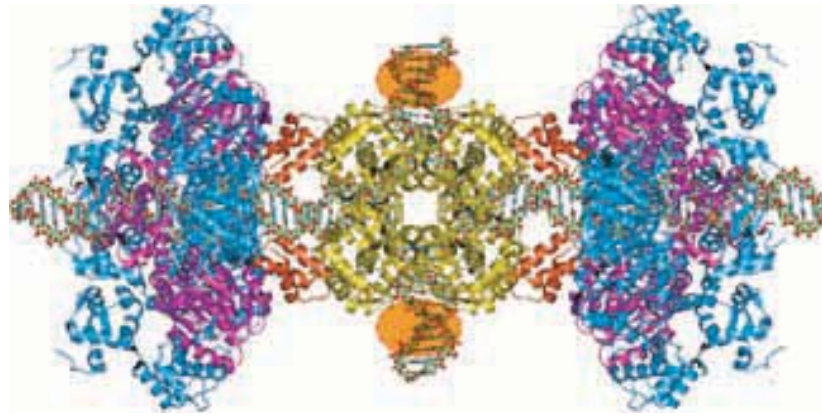


Figura 20.28 ▲
Modelo de RuvA y RuvB enlazadas a una unión de Holliday.

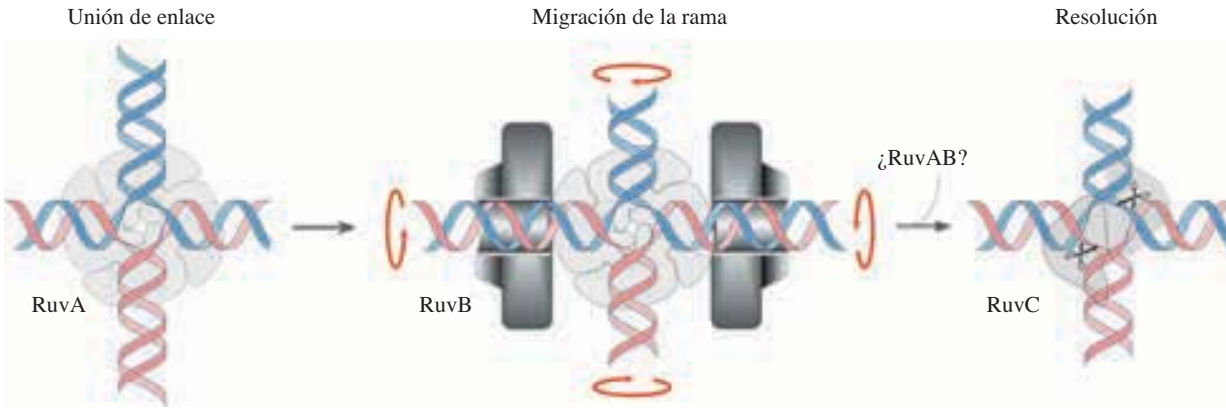
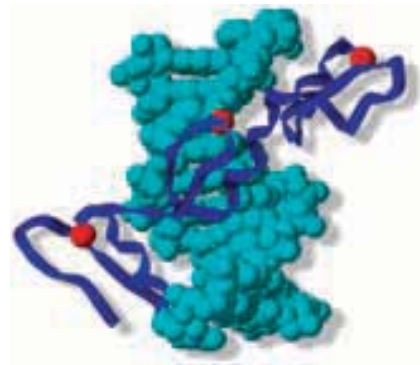


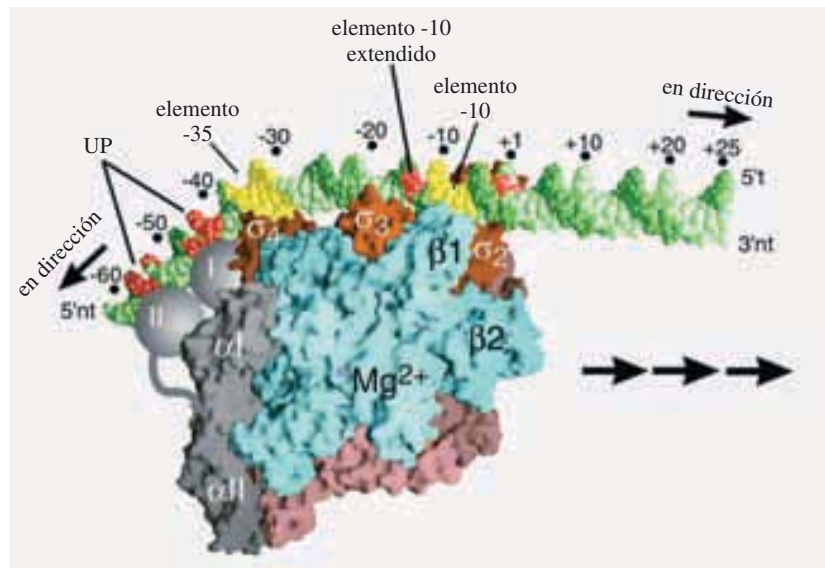
Figura 20.29 ▲
Migración y resolución de ramas. [Adaptado de Rafferty, J. B. et al. (1996). Crystal structure of DNA recombination protein RuvA and a model for its binding to the Holliday junction. *Science* 274:415-421].

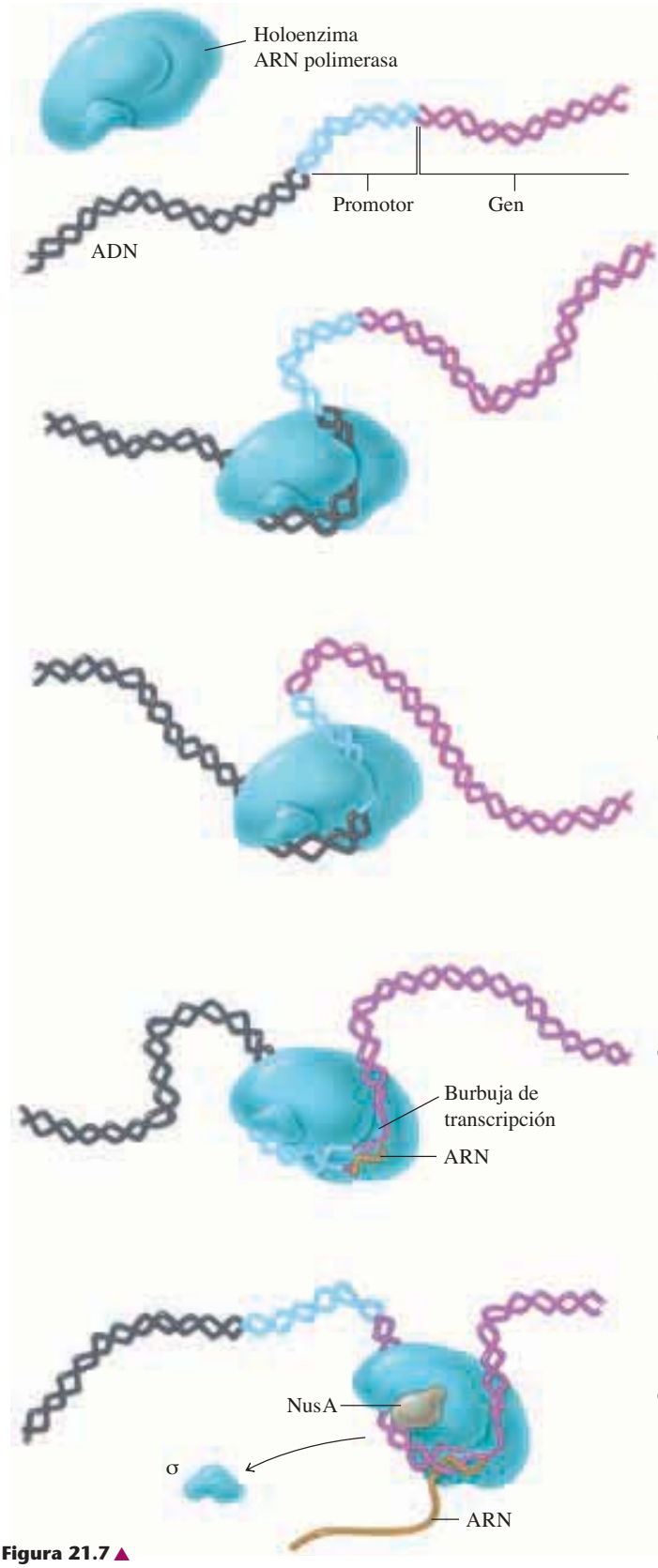


Página 647 ▲

Arriba: Parte del factor de transcripción Zif268 murino (en azul oscuro) unido al ADN (azul claro). Las cadenas laterales de tres dominios con zinc interactúan con pares de bases en el ADN.

Figura 21.2 ▶
Complejo cerrado de la holoenzima ARN polimerasa/ADN promotor de *Thermus aquaticus* (*taq*). La hebra de plantilla es verde oscura y la hebra de codificación verde claro; los elementos –10 y –35 son amarillos. El sitio de inicio de la transcripción se muestra en rojo y se identifica con +1. Una vez que se forme el complejo abierto, la transcripción avanzará en dirección 3′, a la derecha, como indican las flechas. Las subunidades α y ω se muestran en gris; la subunidad β es azul cielo, y la subunidad β′ es color de rosa. La subunidad σ es anaranjada. *Fuente:* Reproducido con autorización de Murakami et. al., Science 296:1285-1290 (2002). Fig. 5A. American Association for the Advancement of Science.





a) La holoenzima ARN polimerasa se une en forma no específica al ADN.

b) La holoenzima hace una búsqueda unidimensional de un promotor.

c) Cuando se encuentra un promotor, la holoenzima y el promotor forman un complejo cerrado.

d) Un cambio de conformación, del complejo cerrado a un complejo abierto, produce una burbuja de transcripción en el sitio de inicio. Entonces se sintetiza un tramo corto de ARN.

e) La subunidad σ se disocia de la enzima central y la ARN polimerasa aleja al promotor. Unas proteínas accesorias, incluyendo NusA, se unen a la polimerasa.

Figura 21.7 ▲
Inicio de la transcripción en *E. coli.*

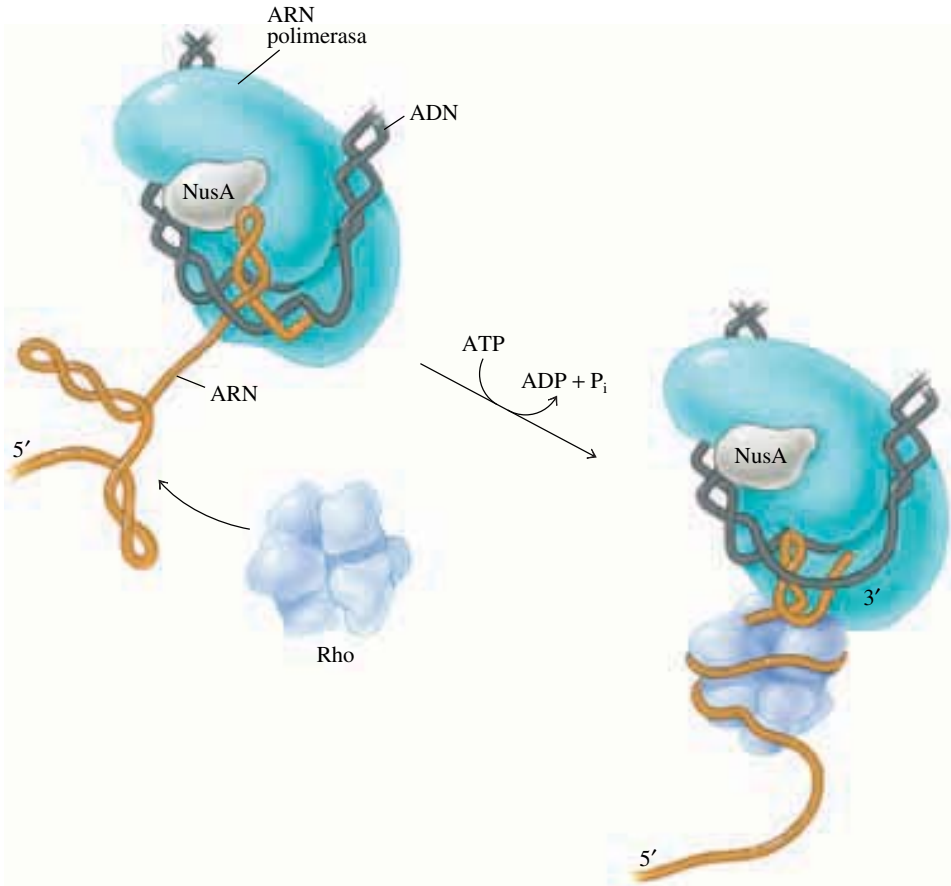
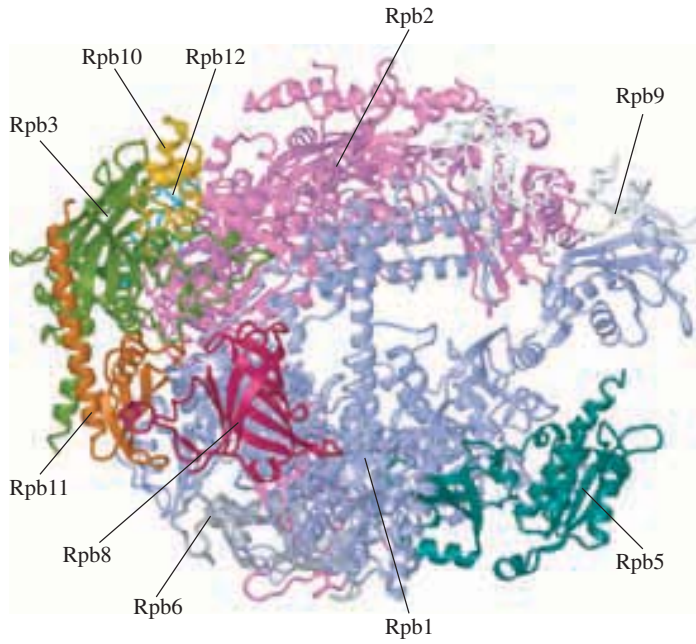
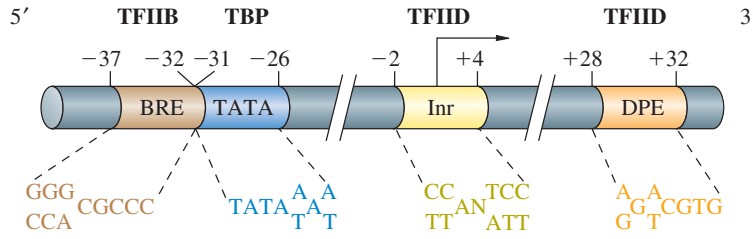


Figura 21.9 ▲
Terminación de la transcripción en *E. coli,* dependiente del factor rho. La ARN polimerasa se traba en un sitio de pausa donde se une el factor *rho* con el ARN recién sintetizado. Esta unión se acompaña con hidrólisis de ATP. Es probable que el factor *rho* envuelva la cadena naciente de ARN sobre sí misma y desestabilice así al híbrido ARN-ADN y la transcripción de terminación. [Adaptado de Platt, T. (1986). Transcription termination and the regulation of gene expression. *Annu. Rev. Biochem.* 55:339-372].



◀Figura 21.10
ARN polimerasa II de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La subunidad grande, de color púrpura (Rpb2) es el homólogo de la subunidad β de la enzima procariótica de la figura 21.2. [PDB 1EN0].



◀Figura 21.11
Promotor eucariótico genérico mostrando los elementos basal o promotores "centrales". La caja TATA se describe en el texto. La BRE es el elemento de reconocimiento TFIIB. La DPE es el elemento promotor en dirección 3. Los nombres de los factores que se unen a cada sitio se muestran arriba del promotor.

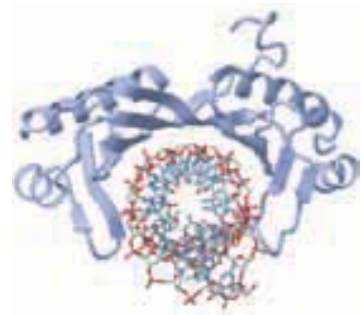
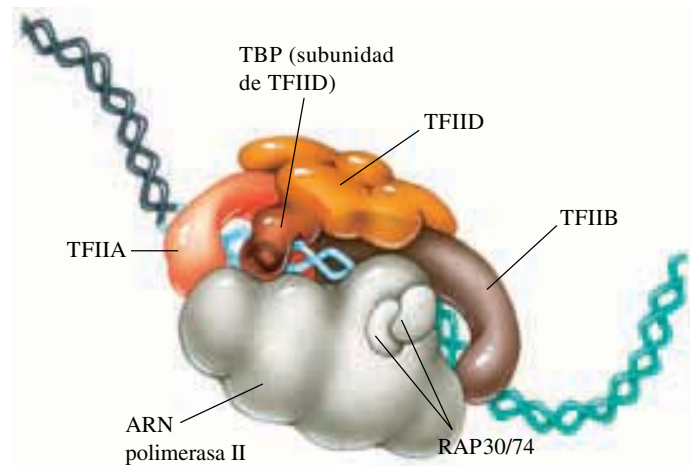
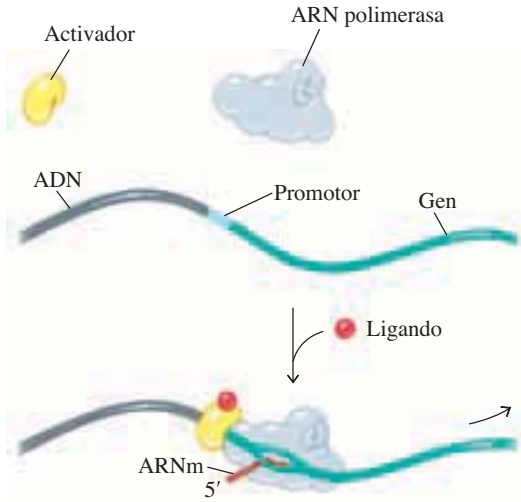


Figura 21.12 ▲
Proteína de unión TATA (TBP) de *Arabidopsis thaliana*, unida a ADN. La TBP (azul) está unida a un fragmento de ADN de doble hebra con una secuencia correspondiente a una caja TATA (5′-TATAAAG-3′). Se muestra el ADN como modelo de armazón de alambre. Nótese que la lámina β de la TBP está en el surco menor del fragmento del ADN. [PDB 1VOL].

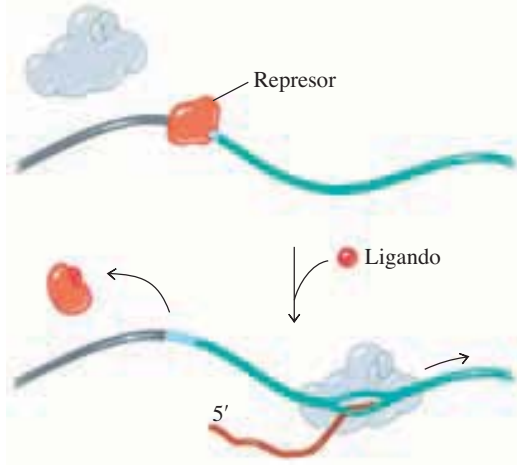
Figura 21.13 ▶
Complejo de la holoenzima ARN polimerasa II unido a un promotor. Este modelo muestra varios factores de transcripción unidos a la ARN polimerasa II en un promotor. Los factores de transcripción a menudo son más grandes y más complejos que los que se ven en este diagrama.



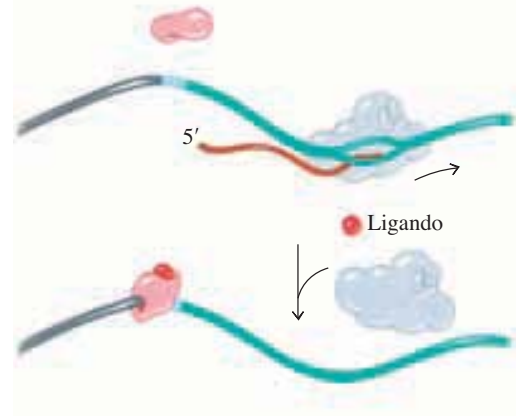


a) Un activador con ligando unido estimula la transcripción.

b) Un activador estimula la transcripción. En presencia de ligando, se inhibe el activador.

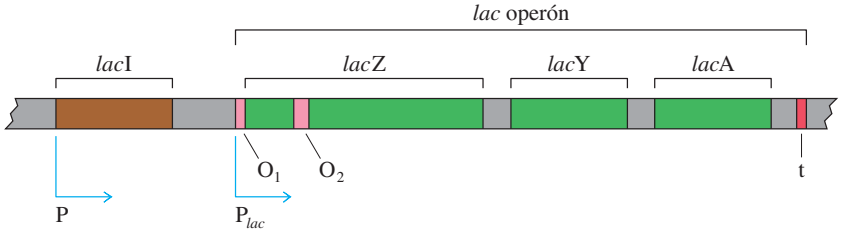


c) Un represor evita la transcripción. La unión del ligando (inductor) al represor inactiva al represor y permite la transcripción.

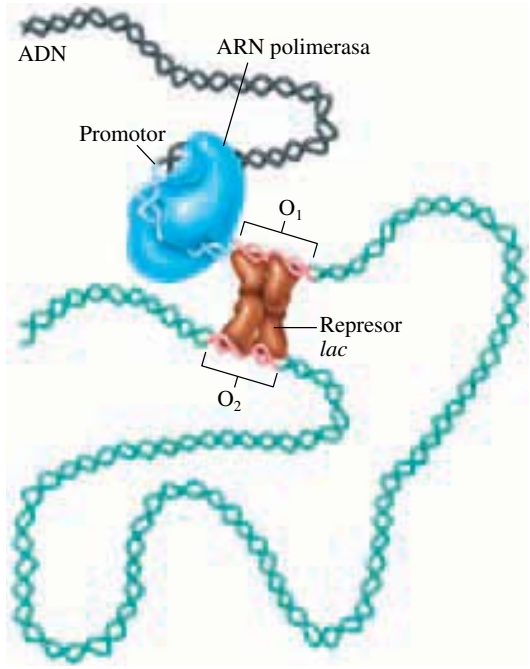


d) En ausencia del ligando, el represor no se une al ADN. La represión sólo sucede cuando está presente el ligando (correpresor).

Figura 21.14 ▲
Estrategias para regular el inicio de la transcripción por parte de proteínas reguladoras.

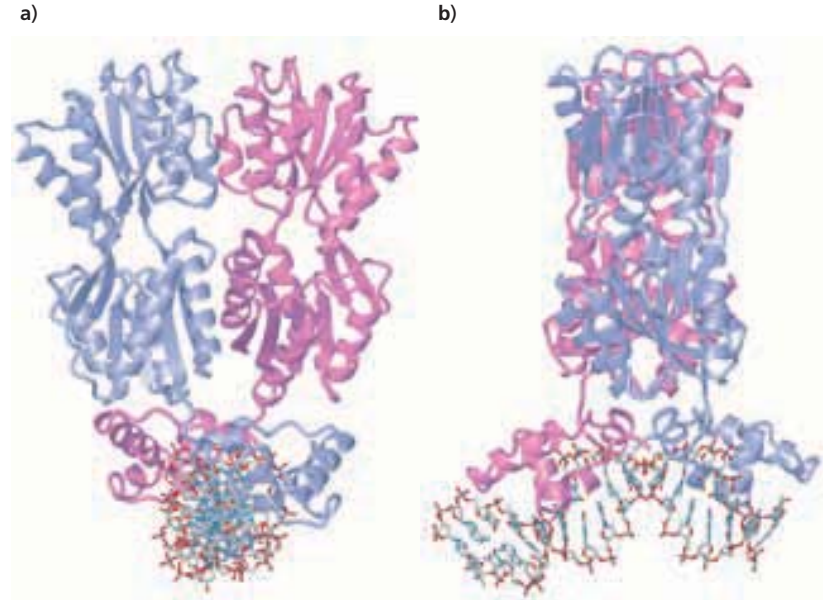


◀ Figura 21.15
Organización de los genes que codifican las proteínas requeridas para metabolizar la lactosa. Las regiones codificantes de tres proteínas, *lacZ, lac*Y y *lac*A, forman el operón *lac* y se cotranscriben desde un solo promotor (P_{lac}). El gen que codifica al represor *lac* es *lac*I, y está hacia 5′ del operón *lac*; tiene su propio promotor, P. El represor *lac* se une a los operadores O_1 y O_2 cerca de P_{lac}. La t representa la secuencia de terminación de transcripción.

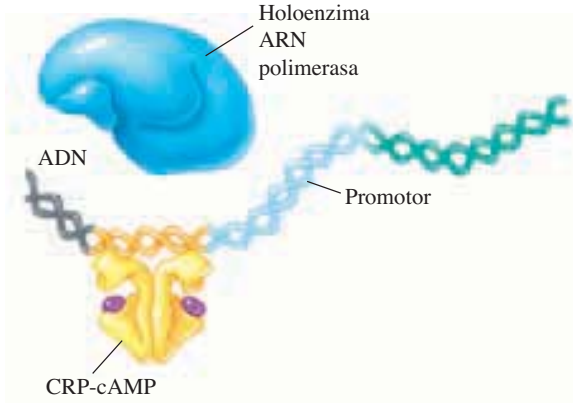


◀Figura 21.17
Unión del represor *lac* con el operón *lac*. El represor *lac* tetramérico interactúa en forma simultánea con dos sitios cerca del promotor del operón *lac*. Entonces se forma un bucle de ADN. La ARN polimerasa se puede seguir uniendo al promotor en presencia del complejo represor *lac*-ADN.

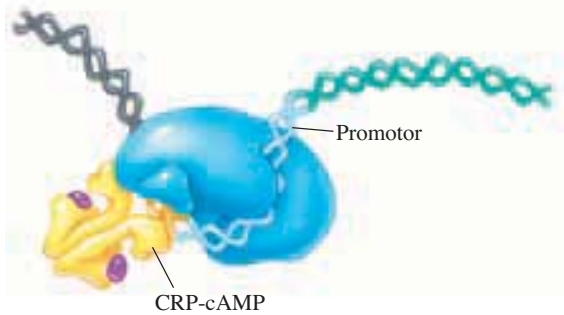
Figura 21.19 ▶
Estructura del represor *lac* de *E. coli*. Esta figura muestra un dímero de las subunidades del represor *lac* unidas a ADN. El represor *lac* es un tetrámero *in vivo*, y contiene dos sitios de unión con ADN. **a)** Vista de la punta de la molécula de ADN. **b)** Vista lateral que muestra la hélice α del represor *lac* en el surco mayor. [PDB 1EFA].



a) La CRP-cAMP se une a un sitio cerca del promotor.



b) La holoenzima ARN polimerasa se une al promotor y también toca al activador unido, con lo que aumenta la rapidez de inicio de la transcripción.



◀Figura 21.20
Activación del inicio de la transcripción en el promotor *lac* por la proteína CRP-cAMP.

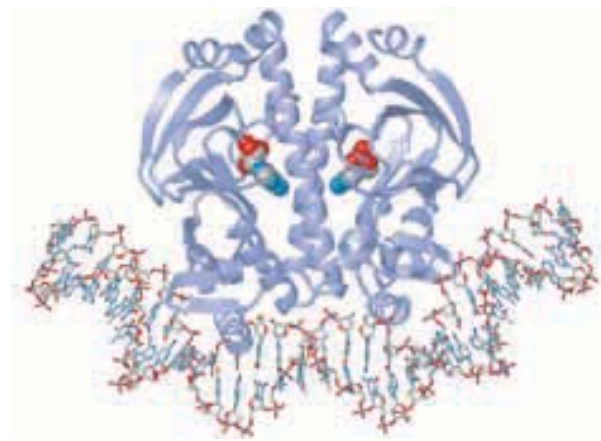
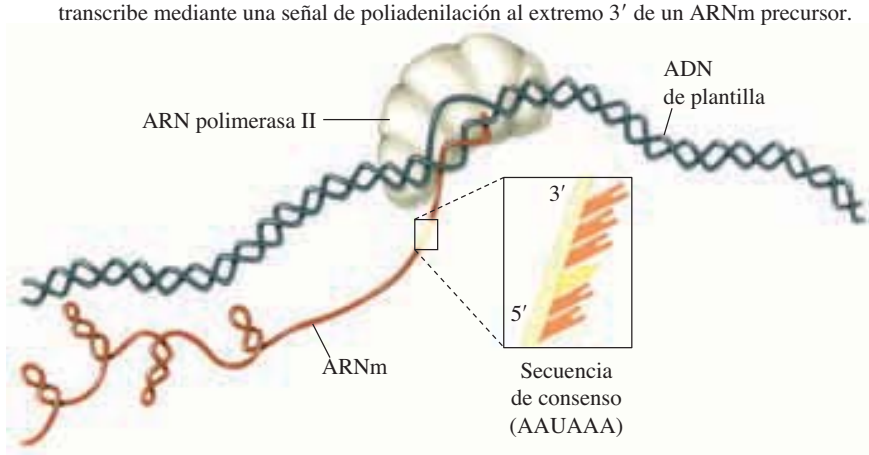
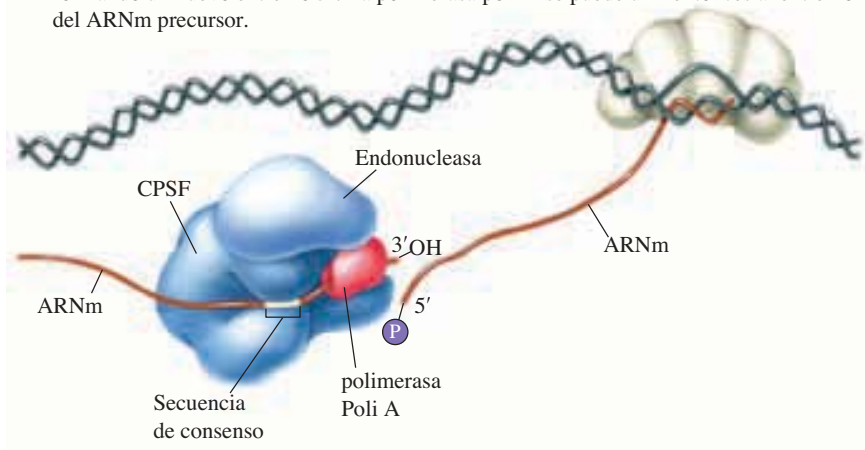


Figura 21.23 ▶
Estructura de un complejo entre la CRP-cAMP y el ADN. Las dos subunidades contienen una molécula de cAMP unida en el sitio alostérico. Cada subunidad tiene una hélice α en posición del surco mayor del ADN, en el sitio de unión con la CRP-cAMP. Nótese que el enlazamiento induce una pequeña flexión en el ADN. [PDB 1CGP].

a) La poliadenilación comienza cuando el complejo de transcripción de la ARN polimerasa II transcribe mediante una señal de poliadenilación al extremo 3′ de un ARNm precursor.



b) El CPSF se une a la secuencia de consenso y forma un complejo que contiene una ARN endonucleasa. La endonucleasa cataliza la ruptura del transcrito en dirección 3′ de la secuencia de poliadenilación, formando un nuevo extremo 3′. La polimerasa poli A se puede unir entonces al extremo del ARNm precursor.



c) La endonucleasa se disocia y el nuevo extremo 3′ del ARN se poliadenila por actividad de la polimerasa poli A

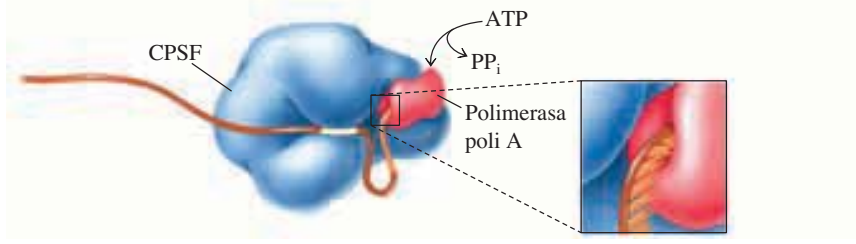


Figura 21.28 ▲
Poliadenilación de un ARNm precursor eucariótico.

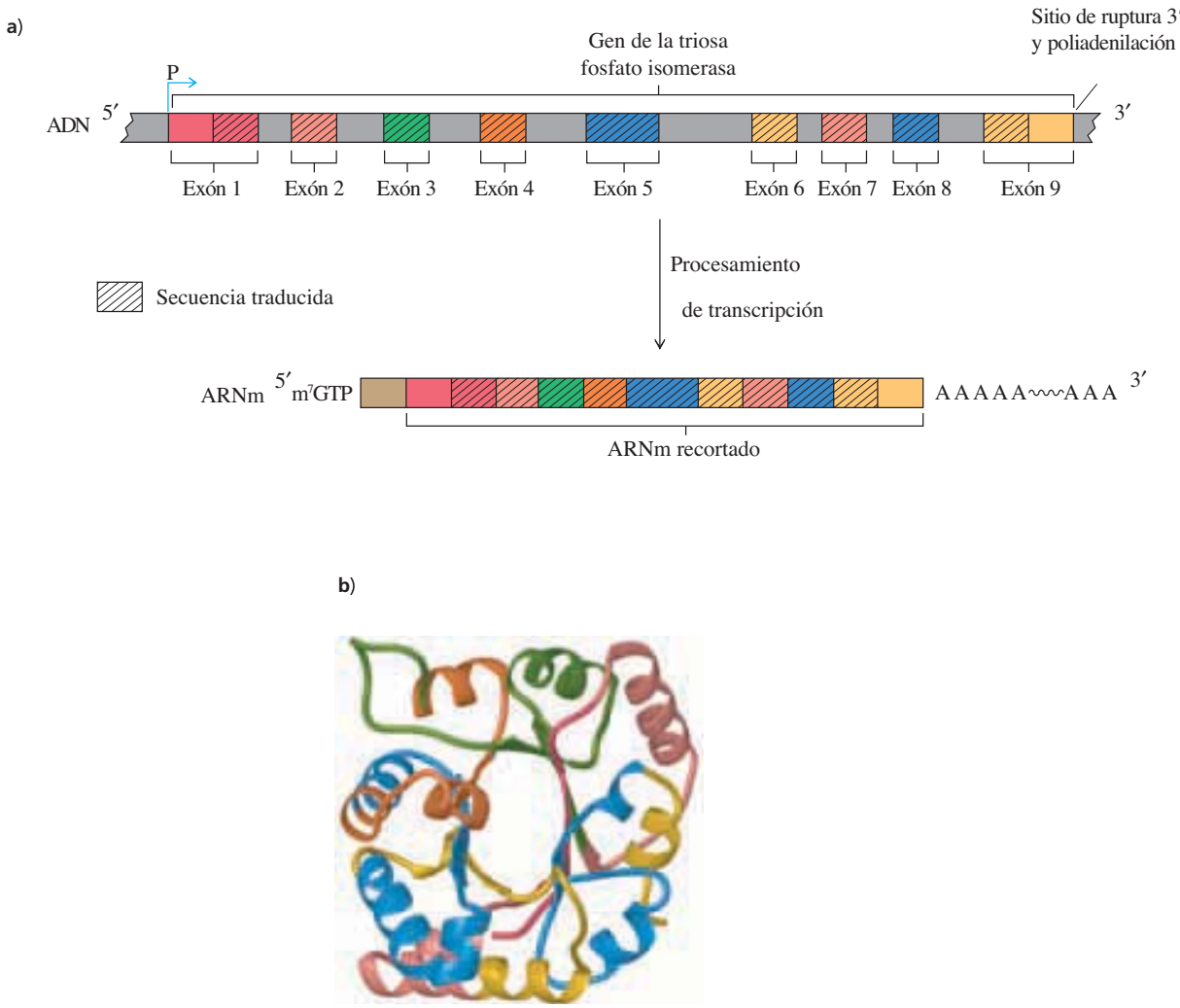
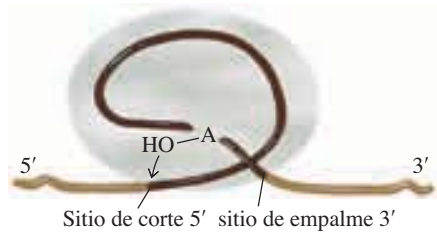
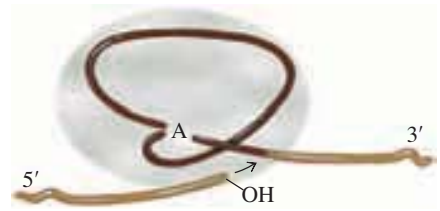


Figura 21.29 ▲
Gen de la triosa fosfato isomerasa de maíz y la enzima codificada. **a)** Diagrama del gen mostrando nueve exones y ocho intrones. Algunos exones contienen secuencias traducidas y no traducidas. **b)** Estructura tridimensional de la proteína que muestra sus partes codificadas por cada exón.

a) El espliceosoma coloca al residuo de adenilato en posición, en el sitio de ramificación cerca del sitio de corte 5′. El grupo 2′-hidroxilo del adenilato ataca al sitio de empalme 5′.



b) El grupo 2′-hidroxilo se fija al extremo 5′ del intrón y el grupo 3′-hidroxilo recién creado del exón ataca al sitio de empalme 3′.



c) La consecuencia es que se unen los extremos de los exones, y se desprende el intrón, una molécula en forma de lazo.

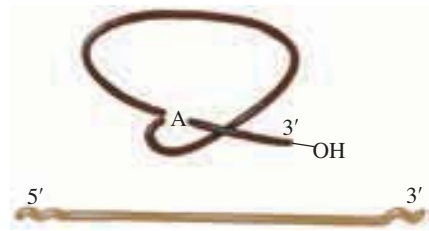
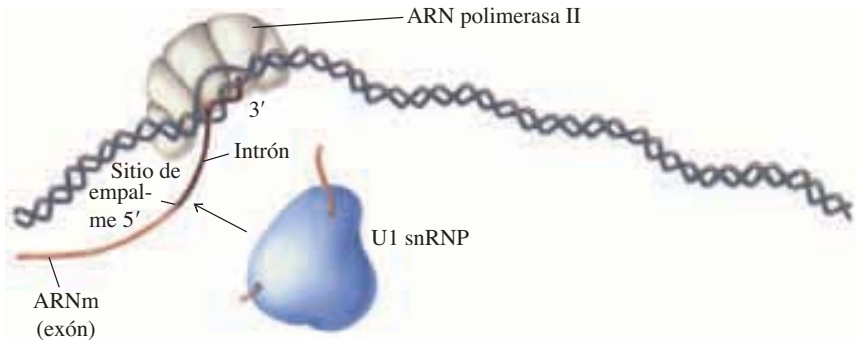
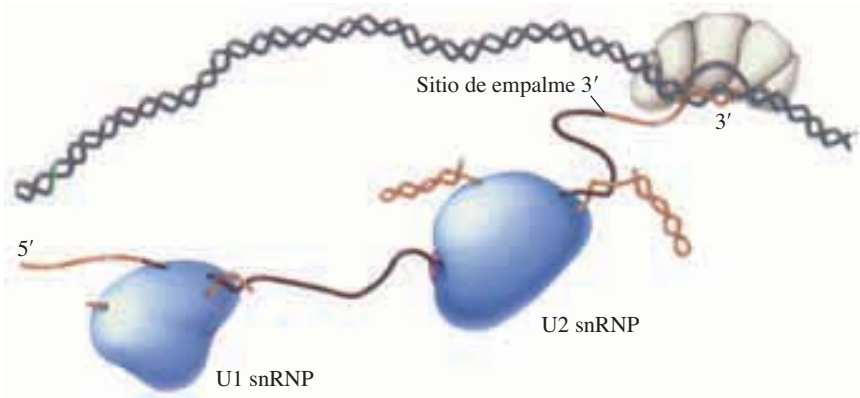


Figura 21.31 ▲
Eliminación de intrón en precursores de los ARNm. El espliceosoma es un complejo de ARN-proteína de varios componentes, y cataliza el empalme. [Adaptado de Sharp, P. A. (1987). Splicing of messenger RNA precursors. *Science* 235:766-771].

a) Tan pronto como el sitio de empalme 5′ sale del complejo de transcripción, una U1 snRNP se une a él.



b) A continuación se une una U2 snRNP al sitio de ramificación dentro del intrón.



c) Cuando sale el sitio de empalme 3′ del complejo de transcripción, se le une una U5 snRNP y se ensambla el espliceosoma completo en torno a una U4/U6 snRNP.

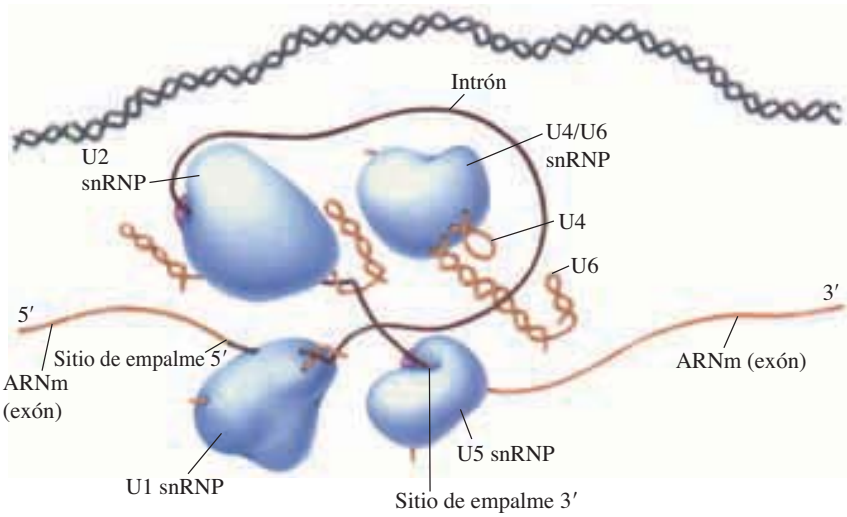


Figura 21.32 ▲
Formación de un espliceosoma.

Figura 22.6 ▲
Estructura de ARNt^{Fen} de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. El modelo de palillos muestra los pares de bases y la posición del brazo D (rojo) en relación con el brazo TψC (verde). Nótese que hay dos hélices de ARN de doble hebra formando ángulos rectos entre sí, en una estructura en forma de L. [NDB TRNA10].

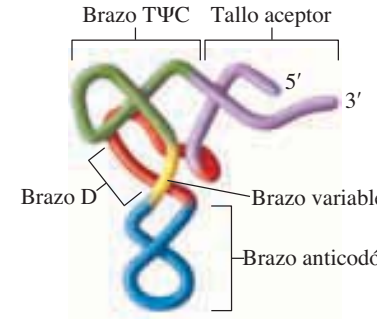
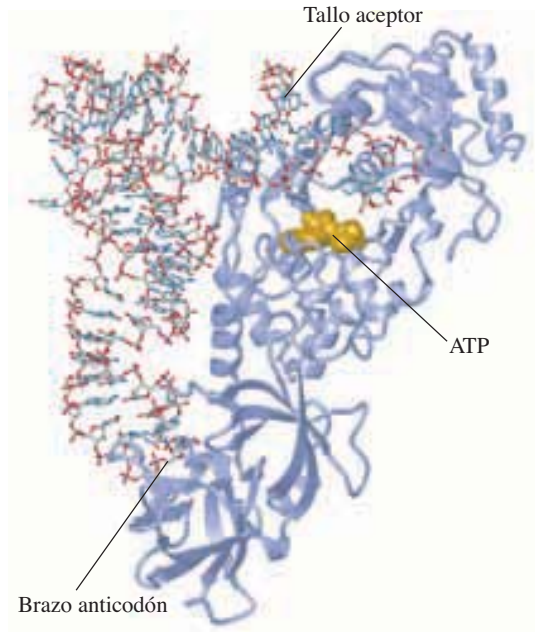


Figura 22.5 ▲
Estructura terciaria del ARNt. La molécula en forma de trébol de la figura 22.4 en realidad se pliega en esta forma tridimensional. La estructura terciaria del ARNt se debe al apareamiento de bases entre el brazo TψC y el brazo D, y dos interacciones de apilamiento que: a) alinean el brazo TψC con el brazo aceptor, y b) alinean el brazo D con el brazo anticodón. Para tener mayor claridad, sólo se muestra aquí el esqueleto de ribosa-fosfato.



◀Figura 22.10
Estructura de ARNt^{Gln} de *E. coli* unido a glutaminil-ARNt sintetasa. El extremo 3′ del ARNt está oculto en una hendidura en la superficie de la enzima. Una molécula de ATP también está unida a este sitio. La enzima interactúa con el tallo aceptor de ARNt y también con el anticodón. [PDB 1QRS].

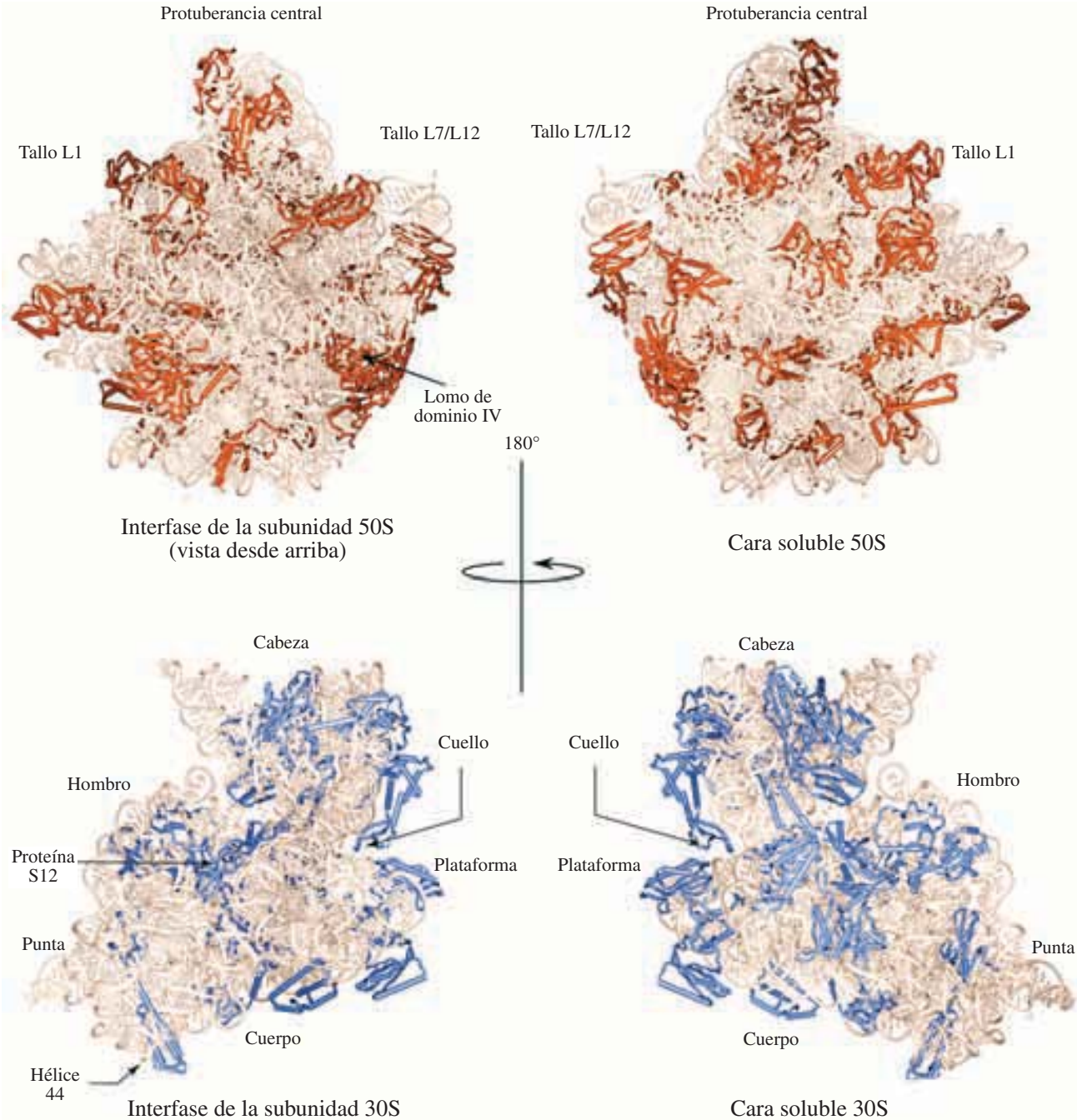


Figura 22.14 ▲
Estructuras tridimensionales de la subunidad 50S en *H. marismortui* (arriba) y de la subunidad 30S de *T. thermophilus* (abajo). En cada subunidad, el ARN se representa en color crema y las proteínas ribosómicas en anaranjado (50S) o en azul (30S).

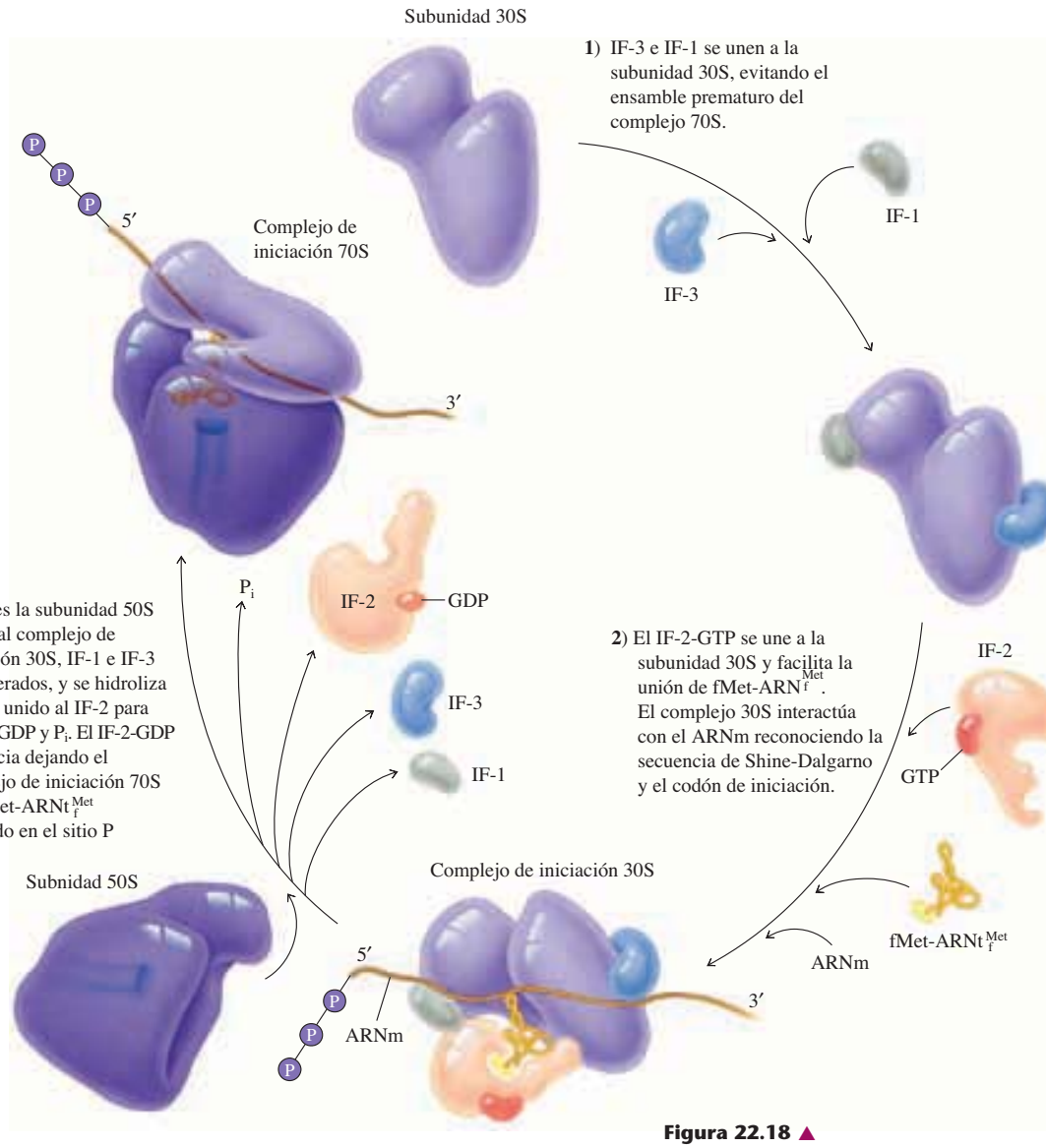
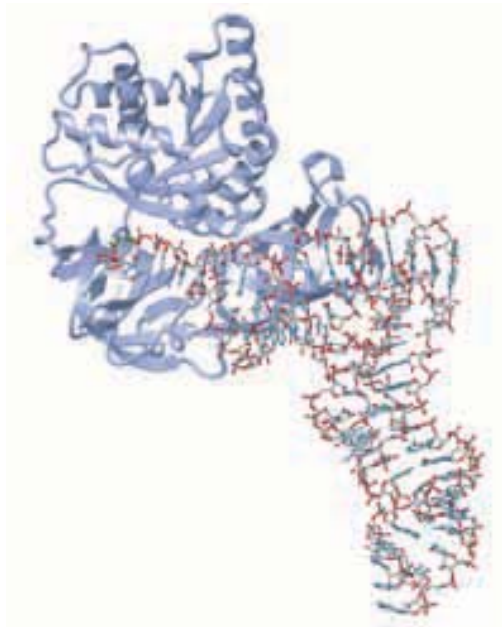
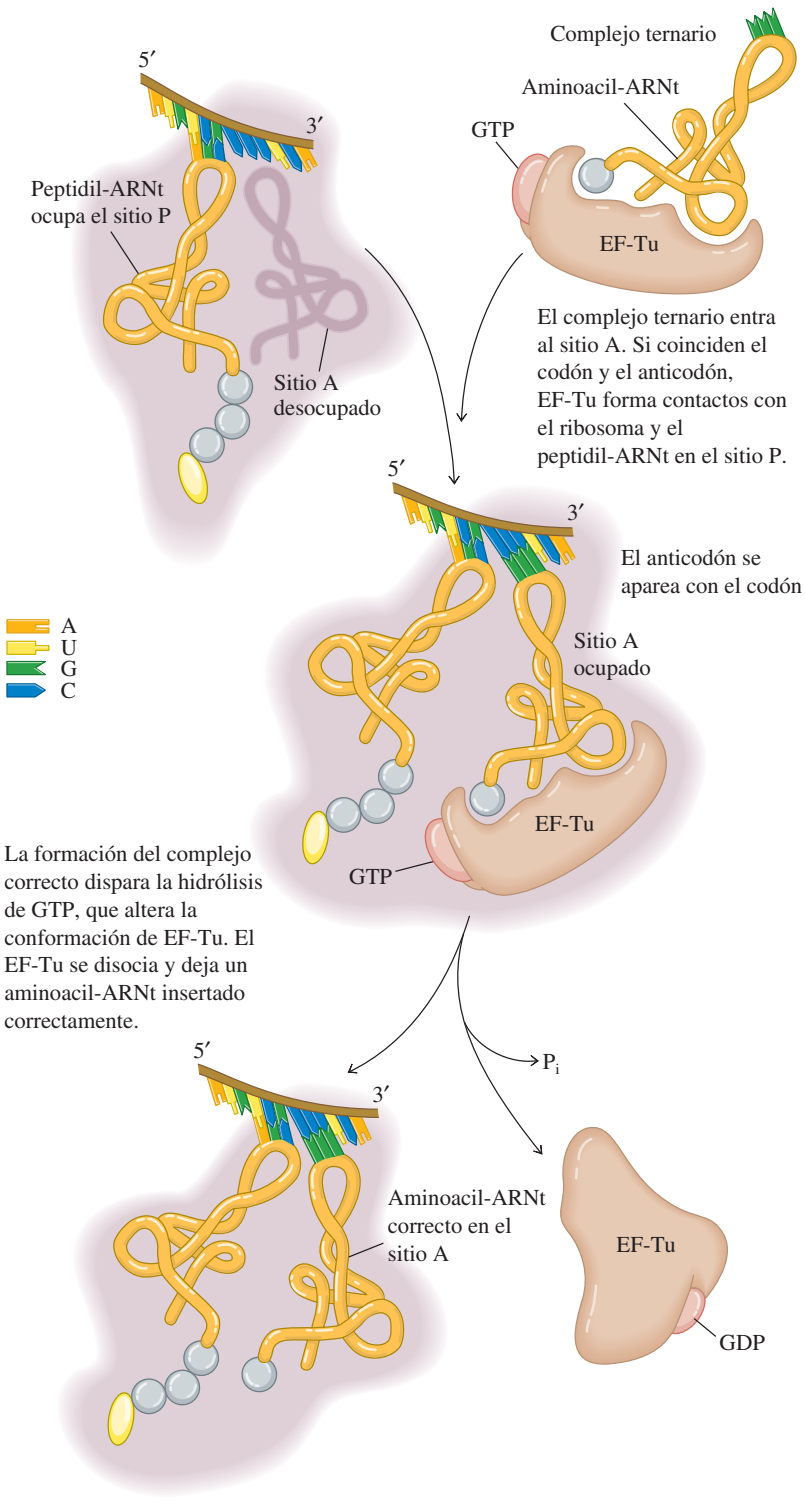


Figura 22.18 ▲
Formación del complejo de iniciación 70S procariótico.

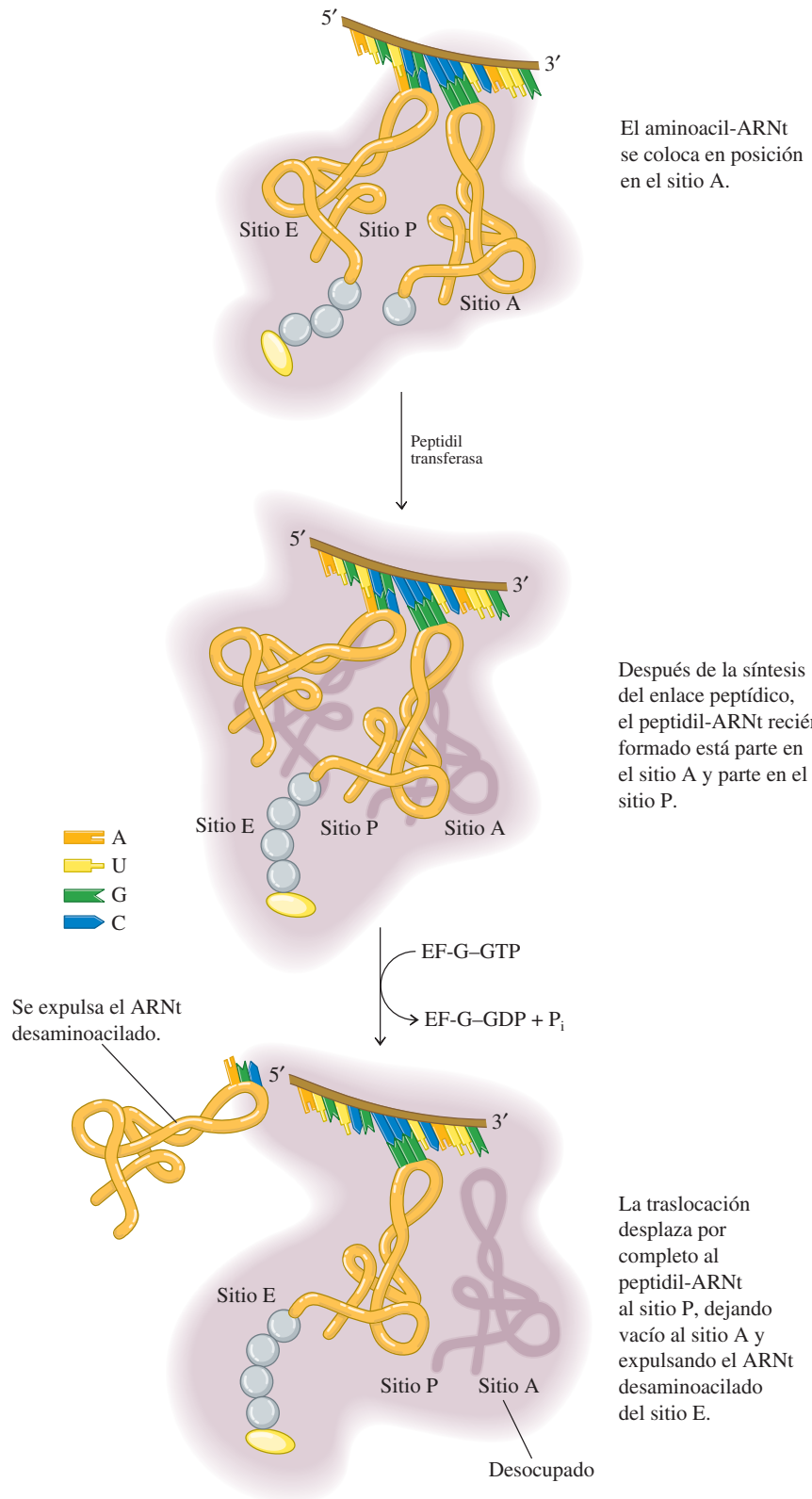


◀ Figura 22.20
EF-Tu se une a los ARNt aminoacilados. El complejo EF-Tu-GTP se une al extremo aceptor del ARNt aminoacilado (en este caso, fenilalanil-ARNt^{Fen}). El residuo de fenilalanina se representa en verde.



◀Figura 22.21
Inserción de un aminoacil-ARNt por EF-Tu durante la elongación de la cadena en *E. coli*.

Figura 22.24 ▶
Traslocación durante la síntesis de proteína en procariotas.



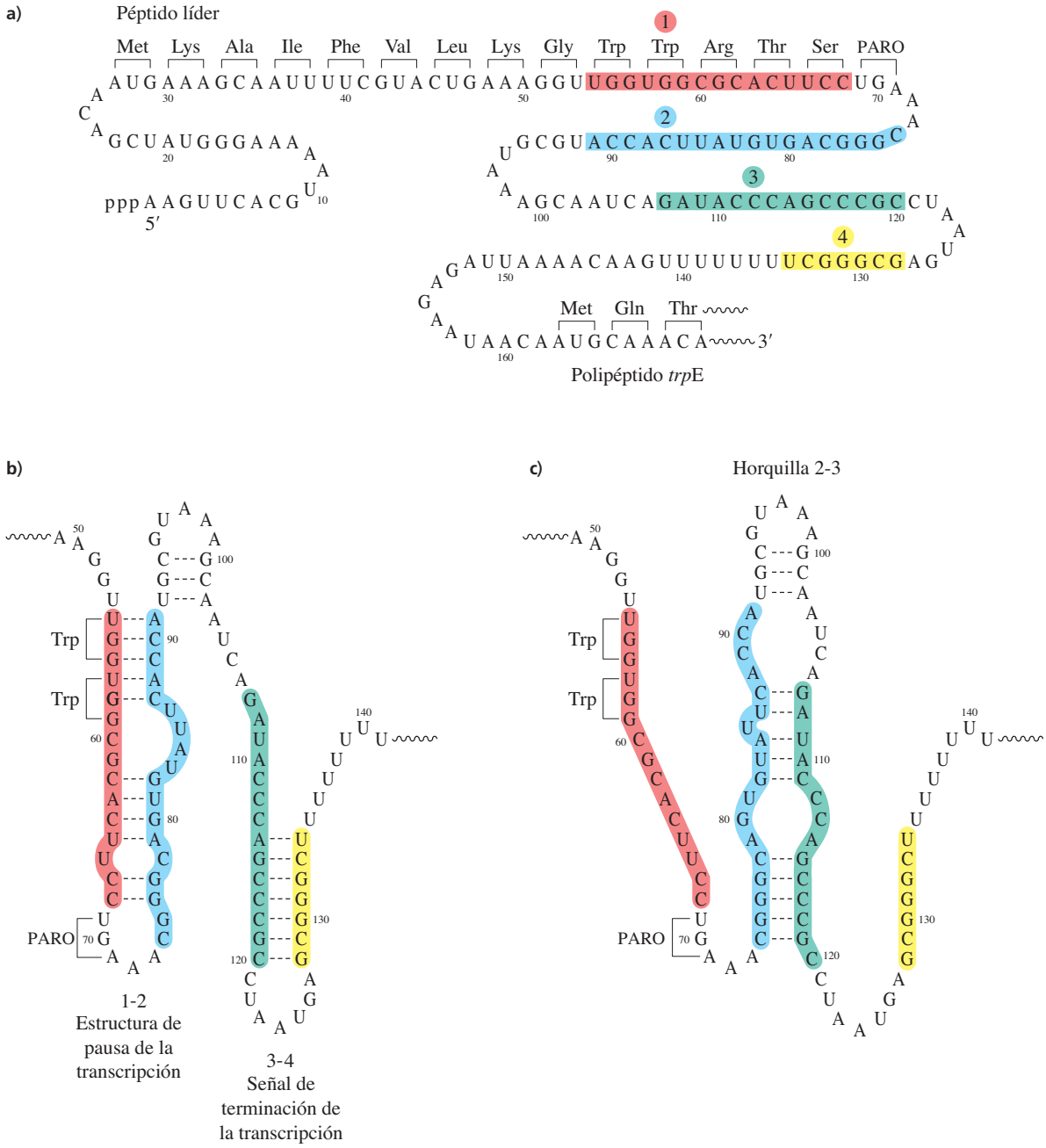
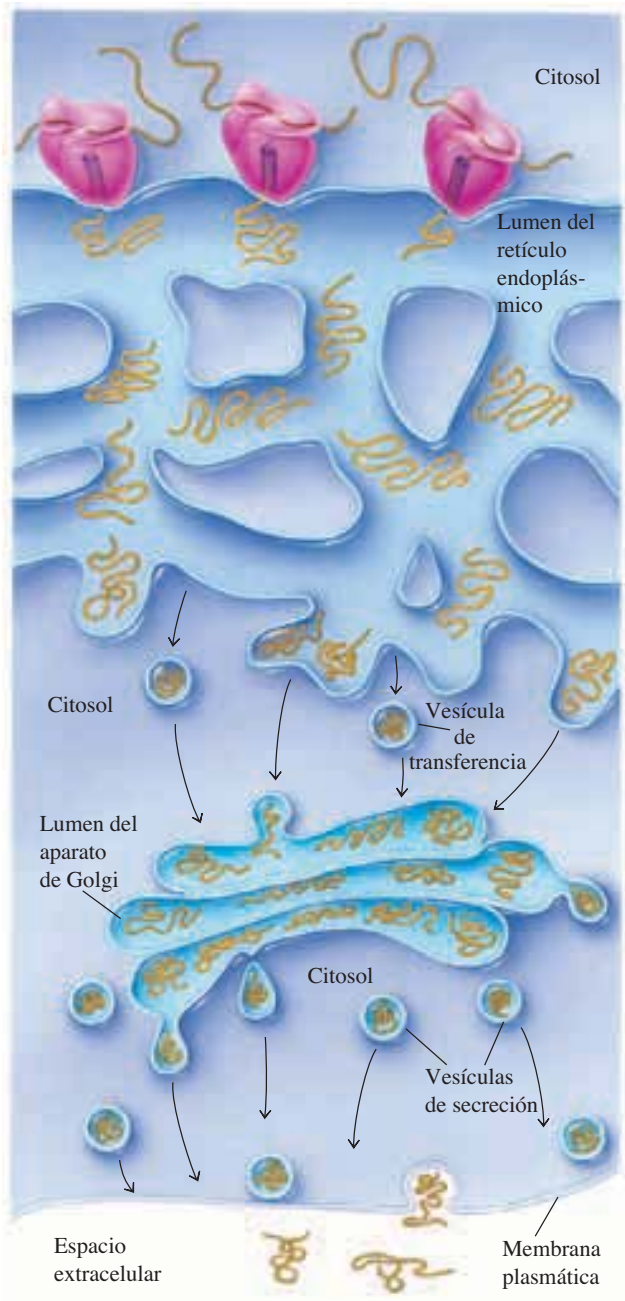
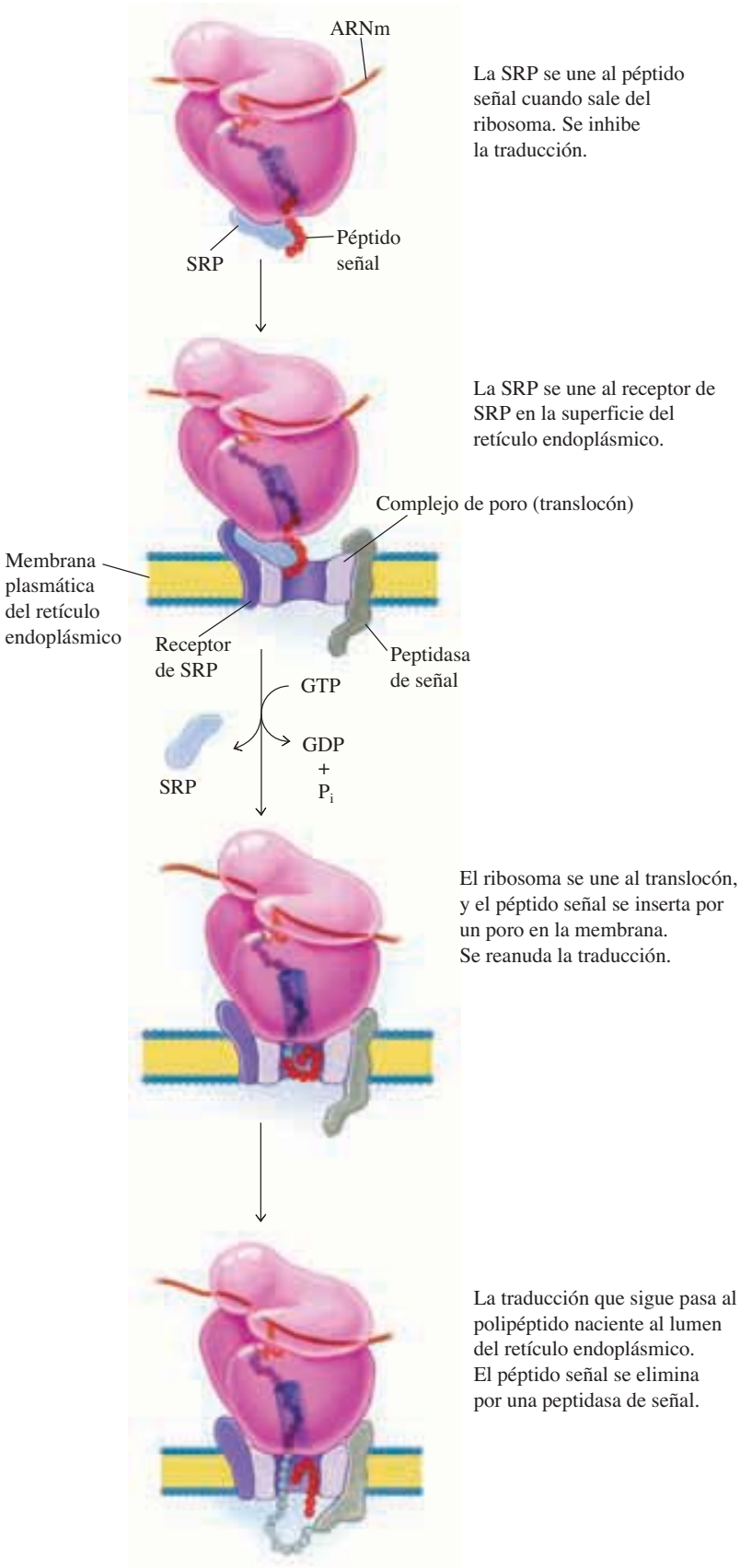


Figura 22.28 ▲
Región líder *trp*. **a)** ARNm transcrito de la región líder *trp*. Esta secuencia de ARNm de 162 nucleótidos contiene cuatro secuencias ricas en GC y la región codificadora para un péptido líder de 14 aminoácidos. La región codificadora incluye dos codones consecutivos que especifican triptófano. Las cuatro secuencias ricas en GC pueden aparear sus bases para formar una de dos estructuras secundarias alternativas. **b)** La secuencia 1 (roja) y la secuencia 2 (azul) son complementarias, y cuando se aparean sus bases forman un sitio de pausa de transcripción típico. La secuencia 3 (verde) y la secuencia 4 (amarilla) son complementarias, y cuando se aparean sus bases forman un sitio de terminación independiente de rho. **c)** También las secuencias 2 y 3 son complementarias y pueden formar una horquilla de ARN que es más estable que la horquilla 3-4. Esta estructura sólo se forma cuando la secuencia 1 no está disponible para la formación de horquilla con la secuencia 2.

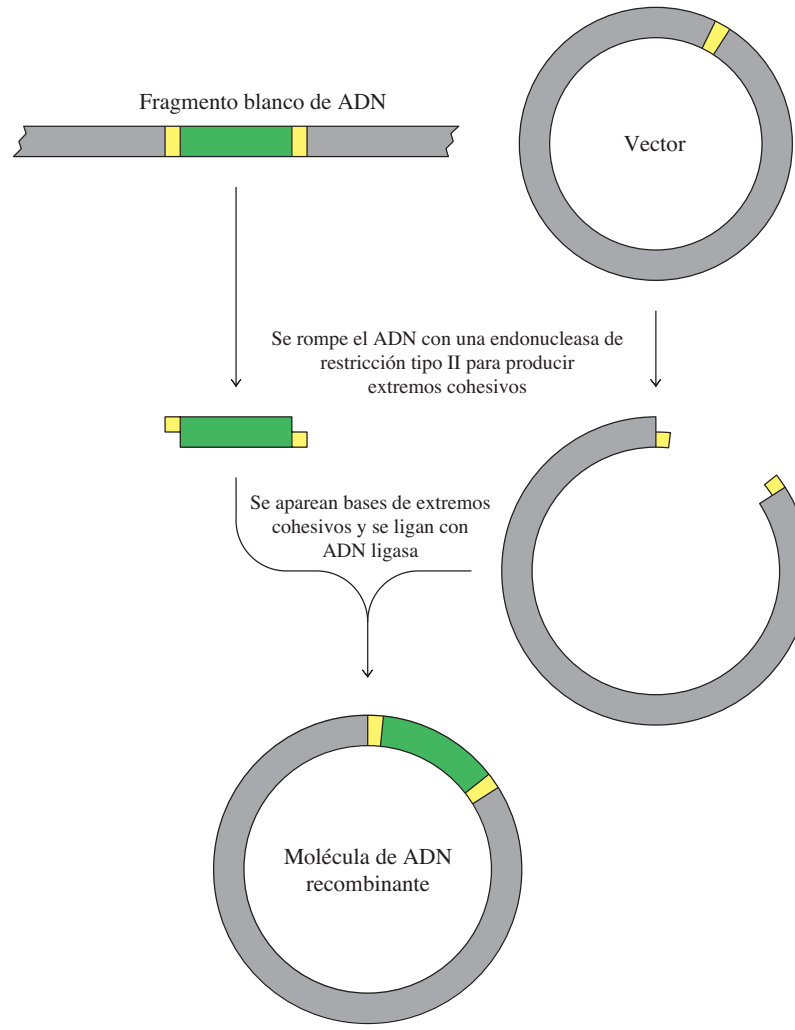


◀Figura 22.29
Ruta de secreción en células eucarióticas. Las proteínas cuya síntesis se inicia en el citosol se transportan al lumen del retículo endoplásmico. Después de más modificaciones en el aparato de Golgi, las proteínas son secretadas.



◀Figura 22.32
Traslocación de proteínas eucarióticas al lumen del retículo endoplásmico.

Figura 23.2 ▶
Uso de enzimas de restricción para generar ADN recombinante. El ADN vector y el ADN objetivo se dividen con endonucleasas de restricción para generar extremos que puedan unirse entre sí. En casos donde se producen extremos cohesivos, las dos moléculas se unen por revenido (apareamiento de bases) de los extremos complementarios. A continuación las moléculas se unen en forma covalente entre sí en una reacción catalizada por ADN ligasa.



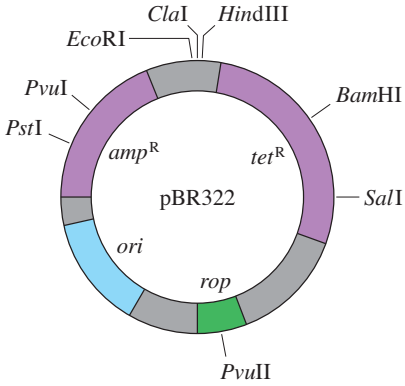


Figura 23.3 ▲
Vector pBR322 de plásmido. Este plásmido es un ADN circular pequeño de 4361 pares de bases. Contiene un origen de replicación (*ori*) y genes que confieren resistencia a los antibióticos ampicilina (amp^R) y tetraciclina (tet^R). El gen *rop* (represor de cebador) regula la replicación del ADN de modo que haya unas 20 copias del plásmido por célula de bacteria. El plásmido también contiene varios sitios únicos de restricción (sólo se ven unos pocos comunes).

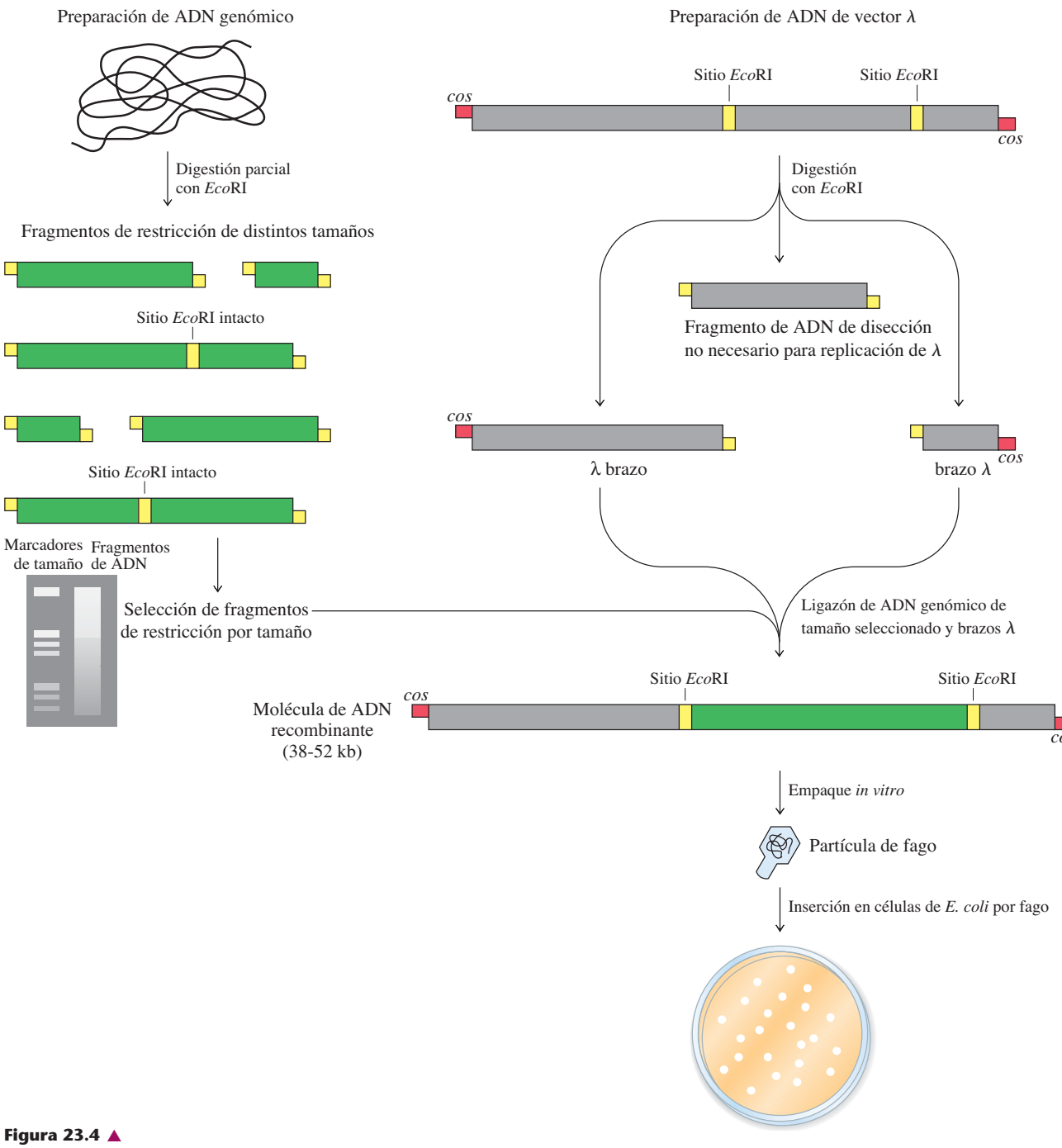


Figura 23.4 ▲
Preparación y uso del vector λ de fago. El ADN del genoma se digiere parcialmente con *Eco*RI (una digestión parcial deja intactos algunos sitios *Eco*RI). Los fragmentos que resultan se separan por electroforesis en un gel de agarosa. (Los fragmentos, que están en la banda derecha, aparecen como una mancha debido al intervalo de sus tamaños). Unas moléculas de ADN de tamaño conocido (marcadores de tamaño) se usan para ubicar en forma adecuada los fragmentos clasificados, que se recuperan del gel y se ligan a los brazos del ADN del vector λ. El ADN del vector λ se prepara digiriéndolo con *Eco*RI, y se obtienen los brazos λ, cada uno de los cuales contiene un sitio *cos* en un extremo. Como los brazos λ se arman en fagos sólo si se ligan para insertar ADN del tamaño correcto, se seleccionan los fagos recombinantes.

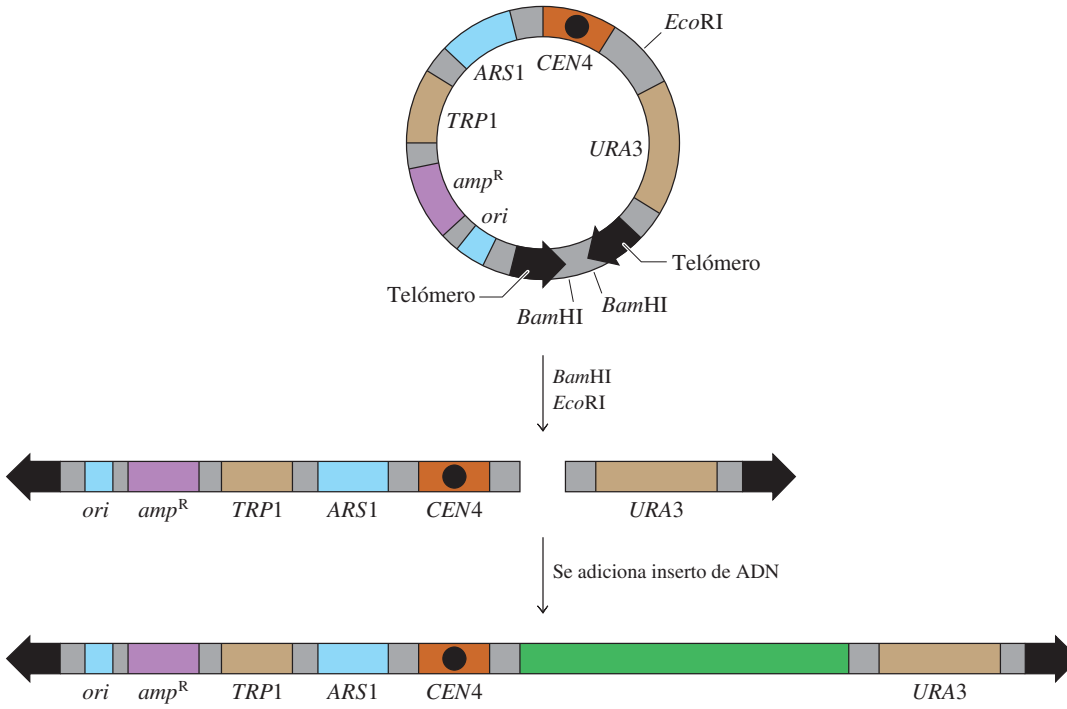


Figura 23.5 ▲
Cromosoma artificial de levadura (YAC). Este vector de lanzadera contiene ADN centromérico de levadura (*CEN*4) y un origen de replicación en levadura (*ARS*1). El plásmido contiene también dos genes marcadores para seleccionar en células de levadura (*TRP*1 y *URA*3) y un gen marcador para selección en *E. coli* (amp^R). Los fragmentos grandes de ADN (400 a 500 kb) se pueden insertar en el sitio *Eco*RI único. Las secuencias teloméricas se ordenan en el plásmido para que al dividirlas con la enzima de restricción *Bam*HI se elimine un fragmento de ADN y quede un vector lineal con extremos teloméricos. Después de una división de la molécula de ADN recombinante por acción de *Bam*HI, el cromosoma artificial lineal se usa para transformar las células de la levadura.

Figura 23.6 ▶
Vector lanzadera de levadura que se puede propagar y seleccionar tanto en *Escherichia coli* como en *Saccharomyces cerevisiae*. Los recombinantes se seleccionan en *E. coli* por su capacidad de crecer en presencia de antibiótico, y en cepas deficientes en *LEU2* por la capacidad de crecer en ausencia de leucina exógena.

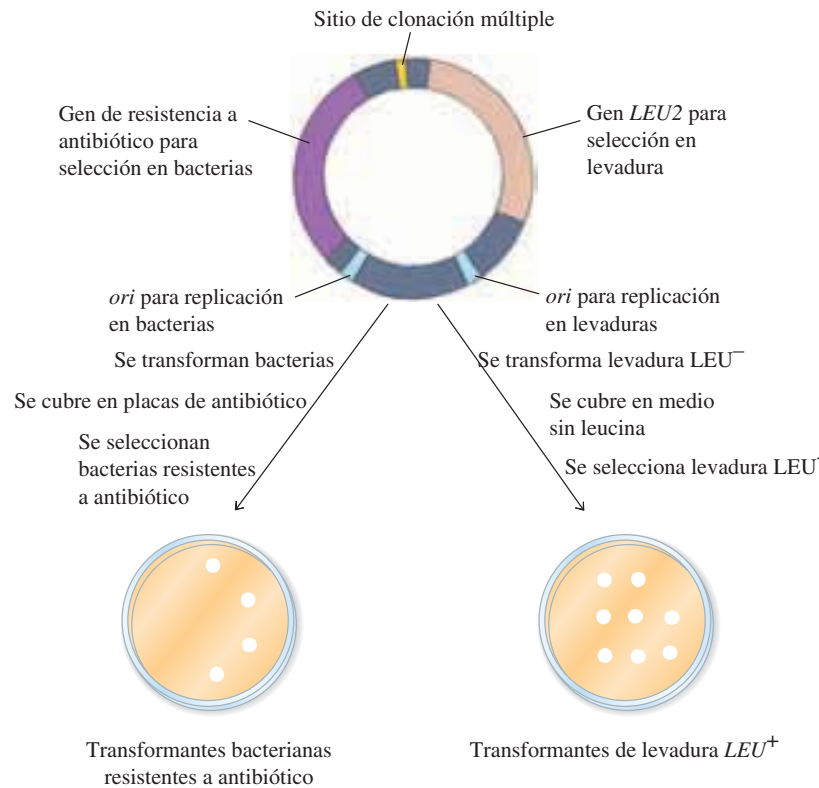
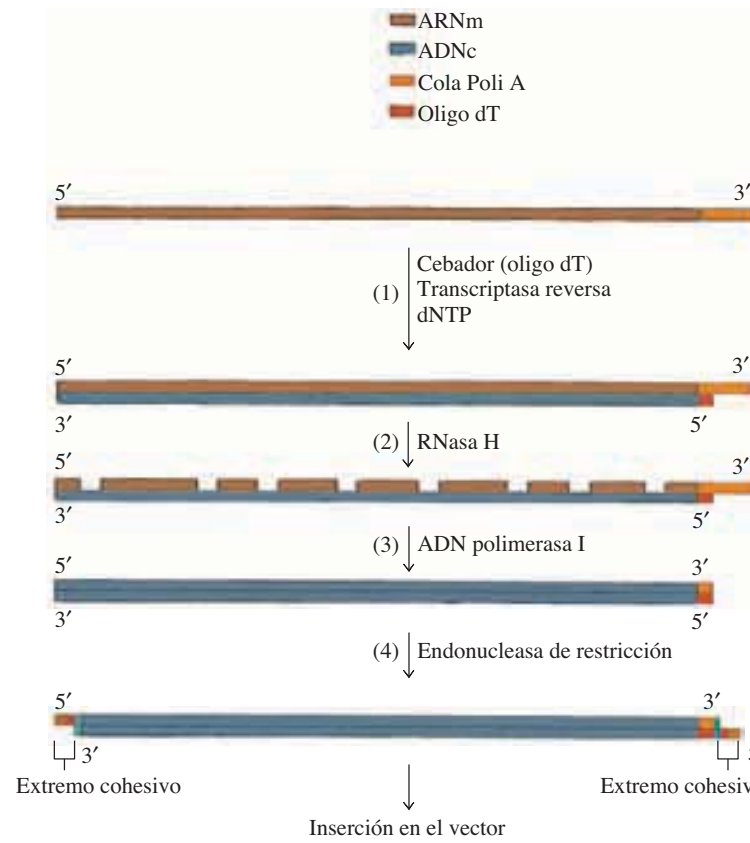
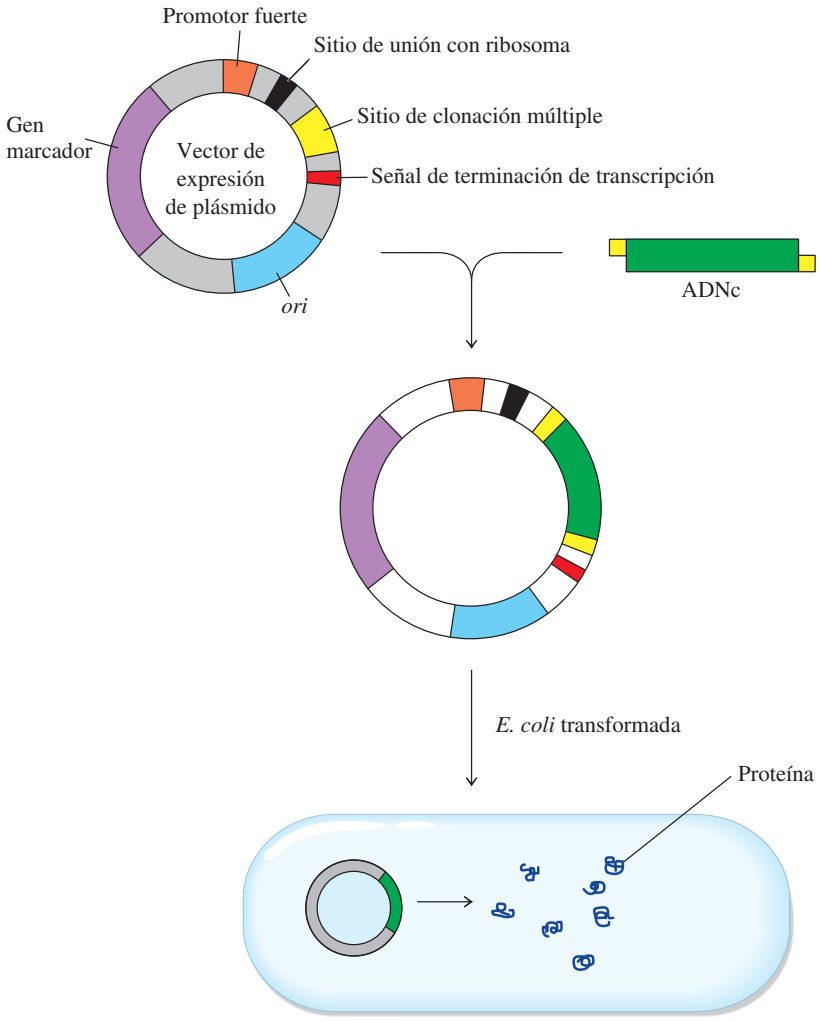


Figura 23.7 ▲
Pantalla azul/blanca. X-gal es un sustrato cromogénico dividido por β-galactosidasa para formar un tinte azul. Las colonias azules representan células transformadas con vectores clonantes que no contienen insertos. En estas células, la β-galactosidasa es activa. Las colonias blancas representan células transformadas con recombinantes. En esas células se ha alterado el gen de β-galactosidasa por el inserto.

Figura 23.8 ▶
Preparación de ADNc.





◀Figura 23.11
Expresión de una proteína eucariótica en *E. coli*.

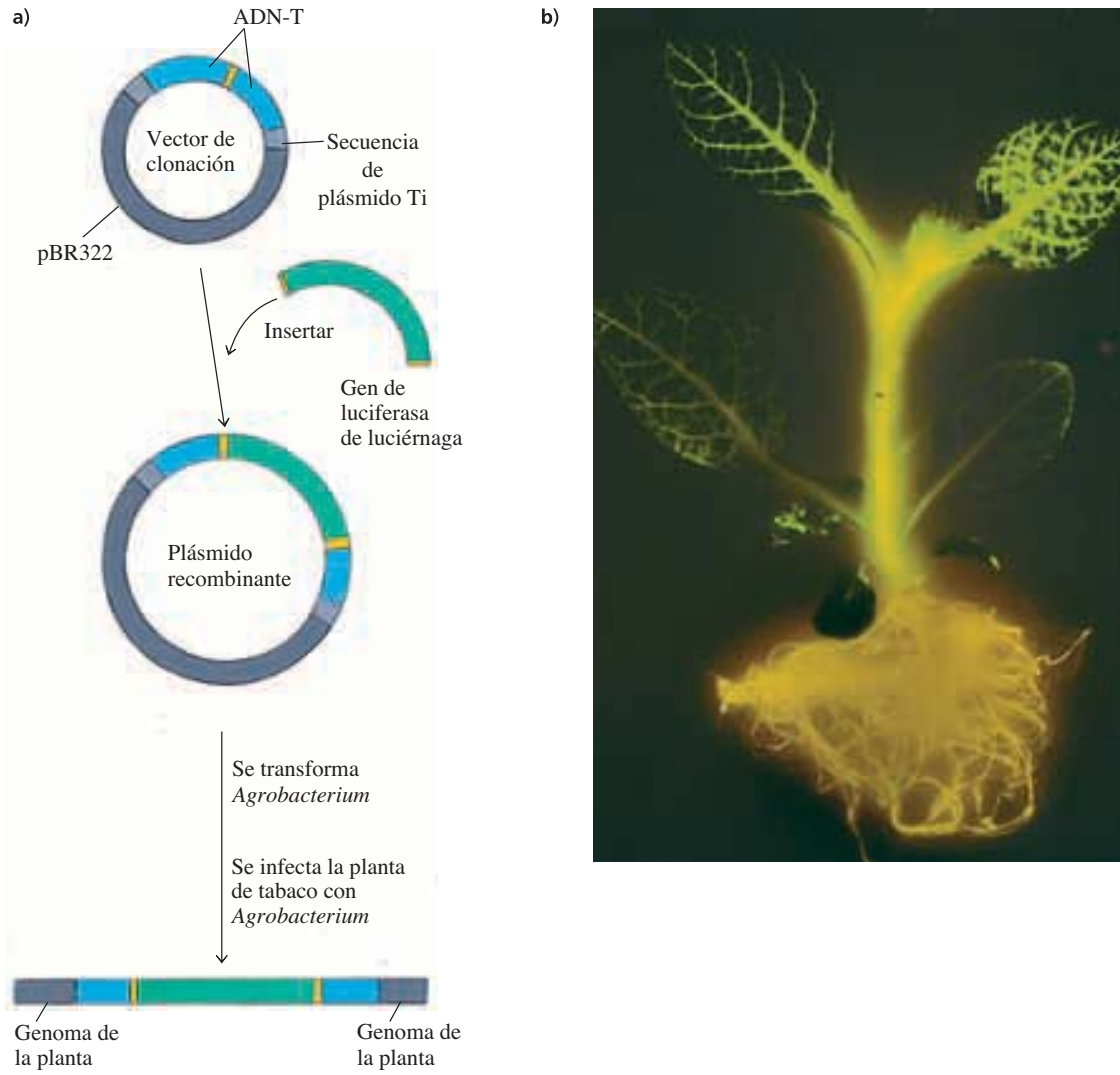


Figura 23.14 ▲
Introducción de ADN ajeno en plantas. **a)** El vector de clonación es un plásmido que lleva secuencias esenciales para replicación y selección en *E. coli* y también secuencias de plásmido Ti. El ADN ajeno se puede insertar en este vector, y en último término integrarse al genoma de la planta huésped. En este ejemplo, el gen de luciferasa de una luciérnaga se transforma en una planta de tabaco, usando el plásmido Ti. **b)** Al regar la planta con una solución de luciferina (sustrato de la luciferasa de luciérnaga), se produce la generación de luz en todos los tejidos de la planta.

Figura 23.15 ▶
Plantas de jitomate resistentes a insectos. La planta de la izquierda contiene un gen que codifica una proteína bacteriana que es tóxica para ciertos insectos que se alimentan de plantas de jitomate. La planta de la derecha es de tipo silvestre. Sólo la planta de la izquierda puede crecer expuesta a los insectos.

Figura 23.17 ▶
Tres ciclos de la reacción en cadena de polimerasa. La secuencia por amplificar se muestra en azul. 1) El ADN dúplex se funde por calentamiento y se enfría en presencia de un gran exceso de dos cebadores (rojo y amarillo) que flanquean la región de interés. 2) Una ADN polimerasa termoestable cataliza la extensión de esos cebadores, copiando cada hebra de ADN. Los ciclos sucesivos de calentamiento y enfriamiento en presencia de los cebadores permiten copiar la secuencia de interés hasta que, después de 20 a 30 ciclos, representa la mayor parte del ADN en la mezcla de reacción.

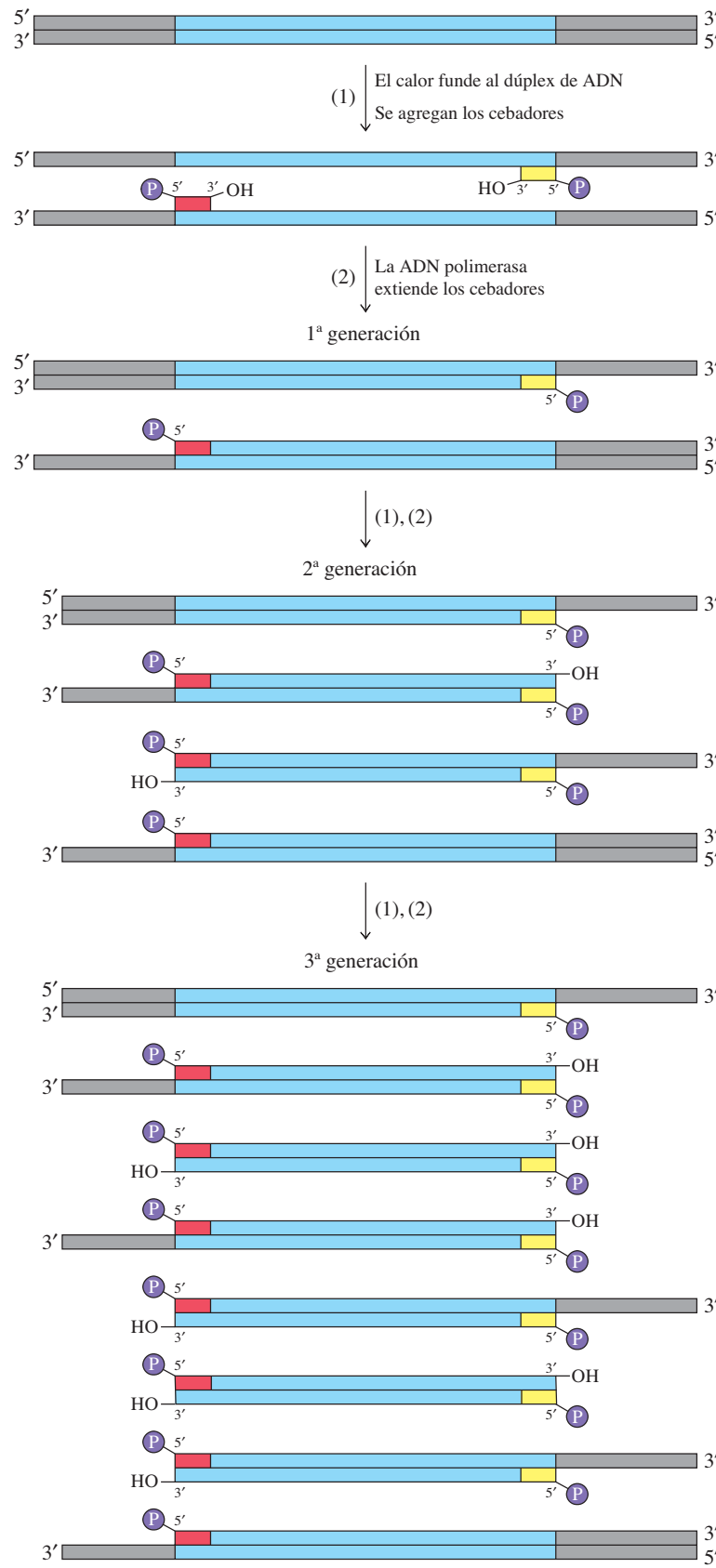
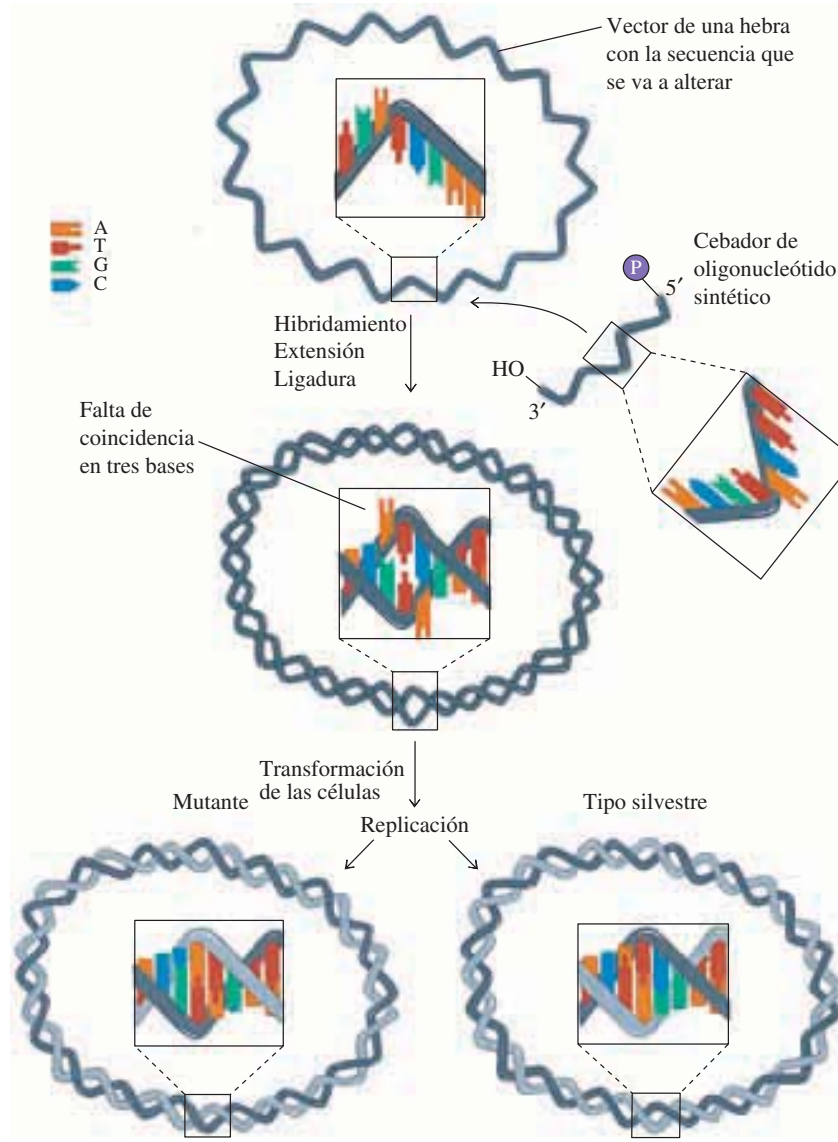


Figura 23.19 ▶
Mutagénesis dirigida a oligonucleótido, específica de sitio. Un oligonucleótido sintético que tiene el cambio deseado (3 pb) se une al vector de una hebra que contiene la secuencia que se va a alterar. El oligonucleótido sintético sirve como cebador para la síntesis de una hebra complementaria. El heterodúplex de doble hebra y circular se transforma en las células de *E. coli*, donde por replicación se producen moléculas de ADN de los tipos mutante y silvestre.



Abreviaturas comunes en bioquímica

ACP	proteína transportadora del acilo
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADP	adenosina 5′-difosfato
AMP	adenosina 5′-monofosfato (adenilato)
cAMP	3′,5′-adenosina monofosfato cíclica
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNr	ácido ribonucleico ribosomal
snARN	ácido ribonucleico pequeño nuclear
ARNt	ácido ribonucleico de transferencia
ATP	adenosina 5′-trifosfato
bp	pares de bases
1,3BPG	1,3-*bi*fosfoglicerato
2,3BPG	2,3-*bi*fosfoglicerato
CDP	citidina 5′-difosfato
CMP	citidina 5′-monofosfato (citidilato)
CoA	coenzima A
CTP	citidina 5′-trifosfato
DHAP	dihidroxiacetona fosfato
DNasa	desoxirribonucleasa
E°	potencial de reducción
$E^{\circ\prime}$	potencial de reducción estándar
EF	factor de elongación
emf	fuerza electromotriz
ETF	flavoproteína de transferencia de electrones
$\mathcal{F}$	constante de Faraday
FAD	flavina adenina dinucleótido
$FADH_2$	flavina adenina dinucleótido reducida
F1,6BP	fructosa 1,6-*bi*fosfato
FMN	flavina mononucleótido
$FMNH_2$	flavina mononucleótido reducida
F6P	fructosa 6-fosfato
ΔG	cambio de energía libre actual
$\Delta G^{\circ\prime}$	cambio de energía libre estándar
GDP	guanosina 5′-difosfato
GMP	guanosina 5′-monofosfato (guanilato)
cGMP	3,5′-guanosina monofosfato cíclica
G3P	gliceraldehido 3-fosfato
G6P	glucosa 6-fosfato
GTP	guanosina 5′-trifosfato
H	entalpía
Hb	hemoglobina
HDL	lipoproteína de alta densidad
HETPP	hidroxietiltiamina pirofosfato
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
IDL	lipoproteína de densidad intermedia
IF	factor de iniciación
eIF	factor de iniciación eucariótico
IMP	inosina 5′-monofosfato
IP_3	inositol 1,4,5-*tri*fosfato
K_a	constante de disociación ácida
k_{cat}	constante catalítica
K_{eq}	constante de equilibrio
K_m	constante de Michaelis
kb	kilopares de bases
LDL	lipoproteína de baja densidad
LHC	complejo recolector de luz
M_r	masa molecular relativa
Mb	mioglobina
$NAD^\oplus$	nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido reducida
$NADP^\oplus$	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
$NMN^\oplus$	nicotinamida mononucleótido
NDP	nucleósido 5′-difosfato
NMP	nucleósido 5′-monofosfato
NTP	nucleósido 5′-trifosfato
dNTP	desoxinucleósido trifosfato
P_i	fosfato inorgánico (u ortofosfato)
PAGE	electroforesis con gel de poliacrilamida
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
2PG	2-fosfoglicerato
3PG	3-fosfoglicerato
PEP	fosfoenolpiruvato
PFK	fosfofructocinasa
pI	punto isoeléctrico
PIP_2	fosfatidilinositol 4,5-*bi*fosfato
PLP	piridoxal fosfato
PP_i	pirofosfato inorgánico
PQ	plastoquinona
PQH_2	plastoquinol
PRPP	5-fosforribosil 1-pirofosfato
PSI	fotosistema I
PSII	fotosistema II
Q	ubiquinona
QH_2	ubiquinol
RF	factor de liberación
RNasa	ribonucleasa
snRNP	ribonucleoproteína pequeña nuclear
RPP	ciclo reductivo de la pentosa fosfato
Rubisco	ribulosa 1,5-*bi*fosfato carboxilasa-oxigenasa
S	entropía
dTDP	desoxitimidina 5′-difosfato
TF	factor de transcripción
dTMP	desoxitimidina 5′-monofosfato (timidilato)
TPP	tiamina pirofosfato
dTTP	desoxitimidina 5′-trifosfato
UDP	uridina 5′-difosfato
UMP	uridina 5′-monofosfato (uridilato)
UTP	uridina 5′-trifosfato
V	velocidad
$V_{máx}$	velocidad máxima
v_0	velocidad inicial
VLDL	lipoproteína de muy baja densidad
XMP	xantosina 5′-monofosfato

Las abreviaturas para los aminoácidos son indicadas en las páginas 56-60, y aquellas para las principales bases de pirimidina y purina son dadas en la página 585.